

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Centro de Ciências Biológicas
Graduação em Ciências Biológicas
Laboratório de Virologia Aplicada

Mariana de Almeida do Nascimento

**ESTUDO DA PRESENÇA DE ENTEROVÍRUS, POLIOVÍRUS E
ADENOVÍRUS HUMANOS EM AMOSTRAS DE ÁGUAS DE
MANANCIAIS DE FLORIANÓPOLIS/SC**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Curso de Ciências
Biológicas, Centro de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Santa Catarina, como requisito parcial
para obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas, sob orientação da
Prof^{ra}. Dr^a. Célia Regina Monte Barardi
e MSc. Vanessa Moresco.

Florianópolis
2011

Agradecimentos

A Deus que abre sempre os meus caminhos com sua luz.

À minha família, especialmente à minha mãe, pela formação e valores que me proporcionaram, por todo apoio, compreensão, amizade e amor.

À orientadora Prof. Dra. Célia Regina Monte Barardi pela oportunidade de realizar este trabalho, pela orientação, estímulo, compreensão e amizade.

À Prof. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões pelas sugestões, colaborações e amizade.

À Vanessa Moresco, pela co-orientação neste trabalho, assim como à Gislaine Fongaro e Aline Viancelli. Agradeço a vocês pela paciência, ajuda, ensinamentos e risadas.

Aos colegas do LVA pela amizade, companheirismo, diversão, sugestões e conhecimentos compartilhados.

À banca examinadora, formada pela Caroline Rigotto Borges, Patrícia Hermes Stoco e Thaís Cristine Marques Sincero pela disponibilidade e valiosas contribuições neste trabalho.

Ao meu namorado Álvaro pelo apoio, incentivo e amor em todos os momentos.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Resumo

A poluição de origem fecal é uma preocupação primária de saúde pública em relação às águas ambientais usadas para abastecimento humano. O monitoramento da água a fim de verificar a presença de vírus é necessário, uma vez que os parâmetros microbiológicos de avaliação só incluem indicadores bacterianos fecais. O presente estudo teve como objetivo avaliar a incidência de adenovírus humanos (HAdV), enterovírus e poliovírus (PV) em águas de mananciais de seis pontos de Florianópolis, capital do Estado de Santa Catarina. Quatro dos seis pontos estão localizados na Lagoa do Peri, uma das principais fontes de água para abastecimento da população de Florianópolis. Outro ponto está localizado em uma Escola e o outro em uma associação de moradores. Os HAdV são agentes virais de múltiplas patogêneses, excretados por muitos indivíduos e encontrados em altas concentrações em águas poluídas. O PV é integrante do grupo dos enterovírus e deve ser monitorado no ambiente, já que o vírus selvagem não foi erradicado e indivíduos imunizados com vacina atenuada (Sabin) excretam PV derivado da vacina nas fezes, podendo sofrer mudanças genéticas e readquirir a neurovirulência. Estes vírus foram primeiramente detectados por técnicas moleculares de RT-PCR (enterovírus) e qPCR (HAdV). Amostras positivas para enterovírus no RT-PCR foram submetidas à cultura celular para estudos de infecciosidade viral e distinguir enterovírus de poliovírus. Para HAdV, amostras positivas no qPCR foram submetidas ao ensaio de DNase para inferir sobre partículas virais não danificadas. Quanto aos resultados, todos os pontos de coleta estavam contaminados. HAdV apresentou positividade em 95% das amostras, com média de $2,93 \times 10^7$ cg/L, variando de $1,70 \times 10^6$ to $2,41 \times 10^8$ cg/L e 40% foram positivas para enterovírus, de um total de 60 amostras. Todos os enterovírus foram infecciosos e nenhum PV foi detectado em cultura celular. O ensaio de DNase mostrou a presença de partículas virais não danificadas. A alta incidência de HAdV e enterovírus indicam contaminação das águas de mananciais com efluentes humanos, que é agravado por enterovírus infecciosos, e retratam a falta de cuidados sanitários, justificando a urgente necessidade de adicionar parâmetros virais na vigilância de qualidade das águas, assim como o uso de medidas efetivas para desinfecção de água.

Palavras-chave: virus entéricos, águas de mananciais, técnicas moleculares, cultura celular.

Abstract

Fecal pollution is a primary health concern in relation to environmental waters used for drinking water supply. The monitoring of water quality in order to check the presence of viruses is necessary, since the microbiological quality of environmental waters is most often evaluated by means of fecal indicator bacteria. The present study aimed to evaluate the incidence of human adenoviruses (HAdV), enteroviruses and polioviruses (PV) in spring water from six sites of Florianópolis, capital of Santa Catarina state. Four of them are located at Lagoa do Peri, which is one of the main suppliers of drinking water in Florianópolis, one in a school and the other in a community association. The HAdV are viral agents of multiples pathogenesis, shed by many individuals and they have been found in surveys of polluted waters in high concentrations. PV is part of enteroviruses group and must be monitored on environment, once the wild virus has not been eradicated and individuals immunized with attenuated oral vaccine (Sabin) shed vaccine-derived poliovirus in the feces, which can suffer genetic drifts and regain neurovirulence. The viruses were detected by molecular techniques RT-PCR (enteroviruses) and qPCR (HAdV). Positive samples at RT-PCR of enterovirus were placed in cell culture in vitro for viral infectivity and distinguish enteroviruses from polioviruses. For HAdV, positive samples at qPCR were submitted to DNase assay, to infer about intact particles. The results showed that all of the sampling sites were contaminated. HAdV was present in 95% with an average of 2.93×10^7 cg/L, ranging from 1.70×10^6 to 2.41×10^8 cg/L and enteroviruses in 40% of the 60 samples. All of the enterovirus were infective in cell culture and none PV were detected and the DNase assay showed the presence of intact particles. The high incidence of HAdV and enteroviruses indicates contamination of this water source with human effluents, which is aggravated by enterovirus infectious, and portrays the lack of health care, justifying the urgent necessity to add viral parameters in the water quality surveillance as also use effective measures to water disinfection.

Keywords: enteric viruses, spring water, molecular techniques, cell culture.

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Local de coleta de água na propriedade da Escola | 26 |
| Figura 2. Local de coleta de água na Estação de tratamento de água da SAC | 27 |
| Figura 3. Localização dos pontos de coleta na Lagoa do Peri | 27 |
| Figura 4. Demonstração do efeito citopático do poliovírus vacinal sorotipo 2 em células Vero | 32 |
| Figura 5. Representação esquemática das passagens em cultura celular para detecção de enterovírus e poliovírus viáveis presentes nas amostras | 34 |
| Figura 6. Citotoxicidade das amostras de água previamente negativas para PV em linhagem celular RD | 38 |
| Figura 7. Demonstração do efeito citopático de enterovírus em linhagem celular RD | 39 |
| Figura 8. Demonstração do efeito citopático de poliovírus em linhagem celular L20b | 39 |
| Figura 9. Gráfico Box-Plot apresentando a mediana, intervalo, primeiro (25%) e terceiro (75%) quartis em cópias genômicas por litro (cg/L) de HAdV | 42 |
| Figura 10. Número de cópias genômicas por litro (cg/L) de HAdV detectado em ensaio de qPCR em amostras de água coletadas na Lagoa do Peri | 42 |
| Figura 11. Número de cópias genômicas por litro (cg/L) de HAdV detectado em ensaio de qPCR em amostras de água coletadas na Escola e SAC | 43 |
| Figura 12. Número de cópias genômicas por litro (cg/L) de HAdV detectados nos ensaios de qPCR e qPCR precedido de tratamento enzimático com DNase I nas amostras do ponto de Captação de Água na Lagoa do Peri e média da precipitação dos 7 dias que antecederam as coletas..... | 44 |
| Figura 13. Número de cópias genômicas por litro (cg/L) de HAdV detectados nos ensaios de qPCR e qPCR precedido de tratamento enzimático com DNase I nas amostras do ponto de coleta na Escola e média da precipitação dos 7 dias que antecederam as coletas..... | 45 |
| Figura 14. Número de cópias genômicas por litro (cg/L) de HAdV detectados nos ensaios de qPCR e qPCR precedido de tratamento enzimático com DNase I nas amostras do ponto de coleta na SAC e média da precipitação dos 7 dias que antecederam as coletas | 45 |

Lista de Tabelas e Quadro

| | |
|---|----|
| Quadro 1. Iniciadores e sondas utilizados para quantificação em cópias genômicas de HAdV (Hernroth et al., 2002) | 36 |
| Tabela 1. Detecção e ensaios de viabilidade de enterovírus e poliovírus nas amostras coletadas na SAC e na Escola | 40 |
| Tabela 2. Detecção e ensaios de viabilidade de enterovírus e póliovírus nas amostras coletadas nos quatro pontos da Lagoa do Peri | 41 |
| Tabela 3. Logaritmo da quantificação de genomas de $4,0 \times 10^5$ pfu/mL de HAdV-2 inativado por 1 hora a 99°C e 30 minutos em UV, semeado em água livre de nucleases e em amostra concentrada seguido de tratamento com DNase I..... | 38 |

Lista de Abreviaturas

| | |
|--------|---|
| cDNA | DNA complementar |
| ECP | Efeito Citopático |
| HAdV | Adenovírus humano |
| HAdV-2 | Adenovírus humano tipo 2 |
| IPV | Vacina Inativada de Poliovírus |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| OPV | Vacina Oral de Poliovírus |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase |
| qPCR | Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa |
| RT | Transcrição Reversa |
| SAC | Solução Alternativa de Abastecimento Coletivo |
| UFP | Unidades Formadoras de Placa |
| VAPP | Poliomielite Paralítica Associada à Vacina |

Sumário

| | |
|--|----|
| 1. Contextualização | 17 |
| 1.1. Saneamento e Saúde | 17 |
| 1.2. Vírus Entéricos | 19 |
| 1.2.1. Adenovírus | 21 |
| 1.2.2. Enterovírus | 22 |
| 1.2.2.1. Poliovírus | 23 |
| 2. Objetivos | 24 |
| 2.1. Objetivo Geral | 24 |
| 2.2. Objetivos Específicos | 24 |
| 3. Metodologia | 25 |
| 3.1. Coletas | 25 |
| 3.2. Índices pluviométricos | 28 |
| 3.3. Análise de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> | 28 |
| 3.4. Concentração das amostras de água: Filtração em membrana negativa e reconcentração pelo método Centriprep | 28 |
| 3.5. Estudo da recuperação viral | 29 |
| 3.6. Extração do material genético viral das amostras de água concentradas | 29 |
| 3.7. Detecção de enterovírus por RT-PCR qualitativo | 29 |
| 3.8. Cultivo e manutenção das linhagens celulares | 30 |
| 3.9. Produção das suspensões virais de poliovírus vacinal sorotipo 2 | 31 |
| 3.10. Titulação da suspensão viral de poliovírus vacinal sorotipo 2 | 32 |
| 3.11. Ensaio de citotoxicidade das amostras de água concentradas | 33 |
| 3.12. Cultivo de células para detecção de enterovírus e poliovírus viáveis | 33 |
| 3.13. Detecção e quantificação de adenovírus humanos por PCR quantitativo (qPCR) | 35 |
| 3.14. Teste da integridade de adenovírus através de tratamento com DNase I | 36 |
| 4. Resultados | 37 |
| 4.1. Coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> | 37 |
| 4.2. Citotoxicidade das amostras em linhagem celular | 38 |
| 4.3. RT-PCR para detecção de enterovírus | 38 |
| 4.4. Detecção de enterovírus e poliovírus viáveis | 39 |
| 4.5. Recuperação viral e qPCR para detecção e quantificação de adenovírus humanos | 41 |

| | |
|--|----|
| 4.6. Teste da integridade de adenovírus através de tratamento com DNase I..... | 43 |
| 5. Discussão | 45 |
| 6. Sumário dos principais resultados do presente trabalho | 53 |
| 7. Conclusão..... | 53 |
| 8. Perspectivas | 54 |
| 9. Referências | 55 |
| 10. Anexo I - Laudo de Análise de Água ACOIJOGOC | 65 |

1. Contextualização

1.1. Saneamento e Saúde

Estima-se que no mundo 2,6 bilhões de pessoas não têm acesso ao saneamento e, dentre essas, 884 milhões não têm acesso às fontes de água de qualidade para consumo humano (WHO; UNICEF, 2010). Como consequência, milhões de pessoas, especialmente crianças, morrem todo ano por doenças relacionadas à falta de água potável, saneamento inadequado e baixa higiene (WHO; UNICEF, 2000). Portanto, a não destinação e tratamento incorreto de esgoto implicam em abastecimento e em qualidade de água diminuídos, que pode ser significativamente afetada pela presença de microrganismos entéricos patogênicos, visto que as águas captadas para consumo humano muitas vezes estão contaminadas por dejetos de efluentes sanitários.

No Brasil, somente 55,16% dos municípios são atendidos por rede coletora de esgoto sanitário. Porém, é importante ressaltar que o acesso à rede coletora de esgoto refere-se apenas à existência do serviço no município, sem considerar o número de domicílios atendidos ou se o esgoto depois de recolhido é tratado (IBGE, 2008).

Quanto ao serviço de tratamento de esgoto, este está presente em somente 28,5% dos municípios brasileiros, e em Santa Catarina esse índice cai para 16% (IBGE, 2008). Estes dados retratam a carência e o descaso de cuidados sanitários relacionados à coleta e tratamento de esgoto no Brasil, que refletem na saúde da população. Considerando o conceito de saneamento envolvendo o abastecimento de água potável, a drenagem urbana, a coleta de lixo e o esgotamento sanitário, o Brasil tem neste último, o índice mais baixo de cobertura (IBGE, 2010).

Na cidade de Florianópolis, capital do Estado de Santa Catarina, o sistema de captação e tratamento do esgotamento sanitário abrange um total de 44% da população residente (PMISB, 2009). Esse índice nos mostra que 56% da população de Florianópolis ainda não têm acesso ao destino correto do esgoto que produz, afetando enormemente os recursos hídricos e, conseqüentemente, a prática econômica da malacocultura e pesca - presentes fortemente no Estado -, a saúde e a qualidade de vida de todos os seres que vivem neste contexto geográfico.

Historicamente, Florianópolis teve seu primeiro sistema de tratamento de esgoto inaugurado em 1916, deixando de operar em 1960, quando os resíduos sanitários voltaram a ser despejados diretamente nas águas das baías e praias locais. Com o crescimento acelerado da cidade, valorização do turismo e não podendo mais adiar as responsabilidades sobre os resíduos produzidos pela população cada vez maior, em 1997

foi inaugurada a 1ª etapa do novo sistema com Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) situada na Baía Sul da Ilha, também gerenciada pela concessionária CASAN - Companhia Catarinense de Águas e Saneamento (CASAN, 2010).

Esta mesma concessionária também atende o município de Florianópolis no que diz respeito ao abastecimento de água potável, com três Estações de Tratamento de Água (ETA) denominadas Sistema Norte, Costa Leste Sul e Integrado da Grande Florianópolis (PMISB, 2009).

O município de Florianópolis possui também muitas Soluções Alternativas de Abastecimento Coletivo (SACs), operacionalizadas pela iniciativa privada ou por Associações de Moradores devidamente registradas. Entende-se por SAC aquele sistema de abastecimento de água que não seja o oficial, e que abrange duas ou mais famílias, mantido o controle da qualidade da água, de acordo com a Portaria 518 do Ministério da Saúde de 2004. Essa Portaria prevê que todas as formas de abastecimento de água potável coletivo devem ser monitoradas, quanto à sua potabilidade, pelos órgãos responsáveis pela Saúde Pública local (ANVISA, 2004).

A legislação brasileira, quanto à avaliação microbiológica no monitoramento da qualidade das águas balneárias, limita-se à presença de bactérias coliformes fecais, *Escherichia coli* ou enterococos com suas respectivas quantificações, classificando a água em categorias de excelência, muito boa e satisfatória (CONAMA, 2000). Quanto ao monitoramento da qualidade da água para consumo humano (Portaria MS 518/2004), a legislação prevê a ausência em 100 mL de *Escherichia coli* ou coliformes termotolerantes (ANVISA, 2004).

Entretanto, a Portaria MS 518/2004, que estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, vem sendo revisada desde 2006 em diversos parâmetros. Dentre os padrões microbiológicos da portaria, a Agência Brasileira de Engenharia Sanitária propõem a realização obrigatória de pesquisa para os vírus entéricos (ABES, 2010), uma vez que diversos estudos indicam maior labilidade das bactérias se comparadas aos vírus, quanto à interferência dos fatores ambientais, como a radiação solar, e aos processos de tratamento de água (CALGUA et al., 2008; ENRIQUEZ; HURST; GERBA, 1995; GIRONES et al., 2010; McFETERS et al., 1974; PAYMENT ; TRUDEL; PLANTE, 1985), além de haver uma baixa correlação da presença de bactérias com outros patógenos (HORMAN et al., 2004; PINA et al., 1998).

Nesse contexto, a vigilância ambiental para detectar vírus entéricos no ambiente deveria ser, portanto, uma atividade prevista e de exigência obrigatória pelos órgãos de fiscalização, a fim de promover o controle da contaminação ambiental por efluentes não tratados e o controle de surtos de doenças veiculadas por vírus presentes em água (FONG; LIPP, 2005; PAYMENT; TRUDEL; PLANTE, 1985).

1.2. Vírus Entéricos

Os vírus entéricos podem ser introduzidos em águas de mananciais através do despejo de esgoto humano tratado ou não, despejo de resíduos de animais ou diretamente por humanos ou animais, sendo que estas águas podem ser utilizadas para recreação ou até mesmo para consumo humano. Estes vírus encontram-se distribuídos pelo mundo todo e são conhecidos por causarem um grande número de doenças veiculadas através do contato pessoa-pessoa ou, principalmente, pela ingestão de água e alimentos associados com baixa higiene e condições sanitárias precárias, destacando-se entre as principais doenças as gastroenterites, meningites, miocardites, pneumonias, paralisias e hepatites infecciosas, especialmente em grupos vulneráveis, como crianças e imunodeficientes (FONG; LIPP, 2005; VERHEYEN et al., 2009; WYN-JONES et al., 2011).

Posteriormente à infecção, os vírus entéricos se replicam inicialmente no trato gastrointestinal e são comumente excretados em altas concentrações nas fezes, de 10^5 a 10^{11} partículas virais por grama de fezes (BOSCH, 1998), sendo capazes de contaminar, direta ou indiretamente, águas destinadas ao consumo humano, recreação e áreas de cultivo de moluscos (PINA et al., 1998), por meio do despejo inadequado de esgoto ou pelo seu tratamento muitas vezes ineficiente quanto à eliminação dos vírus entéricos (WYN-JONES; SELLWOOD, 2001). Os surtos ocorrem ocasionalmente em indivíduos suscetíveis, uma vez que dose infectante é extremamente baixa, podendo variar de uma a dez unidades infecciosas para desencadear o processo de infecção (FONG; LIPP, 2005; SANTOS; WIGG; ROMANOS, 2008; VERHEYEN et al., 2009; WYN-JONES; SELLWOOD, 2001).

Como exemplo mais comum de contaminação entérica, a diarreia infecciosa é uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo inteiro. Recentemente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou 2,5 bilhões de casos de doença diarreica em crianças menores de cinco anos de idade e 16% do total de mortes. Dentre os agentes etiológicos, destacam-se vírus, bactérias e parasitas. O rotavírus é o maior agente causal da doença, sendo estimada sua prevalência em 40%

dos casos de diarreia em crianças. De um modo geral, 88% das mortes por diarreia são atribuídas à falta de água potável, ao saneamento inadequado e à baixa higiene. Estudos têm associado que melhorias nas instalações sanitárias reduzem a incidência de diarreia em torno de 36% (WHO; UNICEF, 2009).

O impacto global, no âmbito econômico-trabalhista, das doenças infecciosas associadas aos microrganismos patogênicos decorrentes do despejo inapropriado de resíduos em águas costeiras, tem sido estimado anualmente em torno de 3 milhões de pessoas incapacitadas, gerando uma perda econômica aproximada em 12 bilhões de dólares (POND, 2005).

Dos agentes patogênicos presentes na água, o impacto causado pela contaminação pelos vírus entéricos tem sido menos estudado do que o impacto causado por bactérias e protozoários, devido, principalmente, ao elevado custo de equipamentos e materiais necessários à rotina laboratorial e à dificuldade em se detectar estes agentes em amostras ambientais por estarem em baixas concentrações, além de alguns vírus não serem detectáveis em ensaios de cultura celular (CALGUA et al., 2008; WYN-JONES; SELLWOOD, 2001; WYN-JONES et al., 2011).

Os vírus entéricos são altamente estáveis no ambiente aquático, uma vez que possuem a capacidade de se associarem às partículas de matéria orgânica presentes na água, ficando protegidos da degradação (BOSCH, 1998). Também por possuírem certa resistência aos agentes físicos e químicos de inativação, como a luz ultra-violeta (UV) e o cloro, podem permanecer viáveis ou potencialmente infectantes durante meses na água. Resistindo desta forma às condições ambientais diversas, assim como aos processos de tratamento de água e esgoto, que por sua vez são normalmente destinados ao controle bacteriano e não ao viral (FONG; LIPP, 2005; OKOH; SIBANDA; GUSHA, 2010).

Já no ano de 1983, a Agência Norte-Americana de Proteção Ambiental afirmava que os vírus entéricos constituíam o indicador mais significativo, confiável e eficiente a ser usado no monitoramento ambiental (KARAGANIS et al., 1983), em concordância com os parâmetros bacterianos já vigentes.

Dentre os vírus entéricos, os enterovírus e adenovírus são dois dos mais estudados grupos de vírus, pois são potenciais indicadores de qualidade da água (FONG; LIPP, 2005), podendo assim serem usados como ferramentas no monitoramento de contaminação ambiental por efluentes humanos (SCIPIONI et al., 2000).

Atualmente, a detecção dos vírus entéricos ambientais é realizada através de técnicas moleculares, como a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) qualitativa ou quantitativa, que se baseiam na detecção do genoma viral. Entretanto, essas metodologias não permitem inferir sobre a infecciosidade viral, devido à persistência do material genético de vírus inativados no ambiente. Neste contexto, a aplicação de técnicas que detectem partículas virais viáveis se torna imprescindível para avaliação da infecciosidade viral (BOSCH et al., 2008).

Dentre as metodologias disponíveis, a visualização do efeito citopático (alterações celulares características decorrentes da replicação viral) que o vírus viável causa às células quando se replica no interior das mesmas durante o processo de infecção (FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2007). O tratamento enzimático, através da utilização de enzimas que degradem o material genético viral desprovido de capsídeo, é outra metodologia que tem sido utilizada para diferenciar vírus íntegros de não-íntegros, baseado na habilidade do capsídeo de proteger o genoma de nucleases (BOFILL-MAS et al., 2006; GIRONES et al., 2010; VIANCELLI et al., *in press*).

1.2.1. Adenovírus

Os adenovírus pertencem à família Adenoviridae e são classificados nos seguintes gêneros: *Mastadenovírus*, (infectam homens, símios, bovinos, eqüinos, caninos, suínos, ovinos e roedores), *Aviadenovírus* (infectam aves), *Atadenovírus* (infectam répteis, aves e marsupiais) e *Siadenovírus* (infectam répteis e aves) (FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2007). Os adenovírus responsáveis por infecções em humanos estão classificados no gênero *Mastadenovírus*, que contém 52 sorotipos (JONES II et al., 2007) divididos em seis espécies, designados de A a F, de acordo com suas propriedades físico-químicas, imunológicas e bioquímicas.

Adenovírus são vírus não envelopados, e a partícula viral apresenta um tamanho médio de 90 nm, com capsídeo de morfologia icosaédrica, com fibras projetando-se de cada vértice do icosaédro. O material genético viral é composto por ácido desoxirribonucléico (DNA) de fita dupla associado a proteínas (FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2007).

Atualmente, os adenovírus humanos são reconhecidos como agentes etiológicos causadores de múltiplas doenças, como infecções gastrointestinais (gastroenterite), genitais (uretrite e cervicite), no trato respiratório (faringite, doença respiratória aguda e pneumonia), no globo ocular (conjuntivite) e no sistema nervoso central (meningoencefalite) (FONG; LIPP, 2005; SANTOS; WIGG; ROMANOS, 2008). As

infecções são usualmente moderadas, entretanto existem casos fatais reportados na literatura (POND, 2005).

Sabe-se que todos os 52 sorotipos podem se replicar no trato gastrointestinal sem, no entanto, desenvolver um quadro de gastroenterite, sendo subsequentemente excretados nas fezes (BÁNYAI et al., 2009), podendo assim contaminar esgotos, rios, mares e moluscos, servindo como bons indicadores virais de contaminação fecal humana no ambiente (ALBINANA-GIMENEZ et al., 2009).

Atualmente, a avaliação da presença de enterovírus é o único parâmetro incluído da regulamentação européia para qualidade de águas, no que tange aos parâmetros virais. A proposta de incluir adenovírus como indicador viral de contaminação por dejetos humanos é baseado, primeiramente, no alto número de amostras positivas para adenovírus, mas negativas para enterovírus, e também pela maior estabilidade que os adenovírus apresentam em diversos ambientes, tais como água do mar, águas residuais e água de torneira, quando comparado aos enterovírus (PINA et al., 1998; VAN HEERDEN et al., 2003). Além disso, apresenta grande estabilidade e resistência em condições adversas do meio ambiente, sendo o vírus mais resistente aos modos de desinfecção normalmente empregados, representando, por este motivo, um risco à saúde pública (ENRIQUEZ; HURST; GERBA, 1995; FONG; LIPP, 2005).

1.2.2. Enterovírus

O gênero *Enterovírus* pertencem à Família Picornaviridae e caracterizam-se por serem não envelopados e material genético composto por ácido ribonucléico (RNA) simples fita de polaridade positiva e, portanto, infeccioso, funcionando diretamente como RNA mensageiro. Os enterovírus que infectam humanos estão classificados em 5 espécies: Poliovírus, Coxsackievírus grupo A, Coxsackievírus grupo B, Echovírus e outros Enterovírus (FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2007).

De maneira geral, os enterovírus humanos são adquiridos através de transmissão fecal-oral por serem eliminados nas fezes de indivíduos infectados, que normalmente não apresentam sintomas. Por outro lado, pode-se desenvolver graves quadros de conjuntivite hemorrágica, exantemas, paralisias, podendo em alguns casos levar a morte (FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2007; SANTOS et al., 2008).

Os enterovírus são o grupo viral mais comumente estudado em relação à contaminação em águas ambientais, pois a presença deles no ambiente representa uma ameaça à saúde pública, mesmo se estes

estiverem em pequenas concentrações. Além disso, são o único grupo viral contemplado nas diretrizes da Comunidade Européia para monitoramento do ambiente aquático, e alguns autores sugerem o uso do poliovírus para o monitoramento viral por ser excretado em grandes quantidades nas fezes, devido ao emprego da vacina Sabin (poliovírus atenuado), que é amplamente empregada nas campanhas de vacinação infantil (PUIG et al., 1994).

1.2.2.1. Poliovírus

Os poliovírus pertencem ao gênero *Enterovírus* e por isso partilham as características do gênero. São classificados em três sorotipos - 1, 2 e 3 - de acordo com a natureza antigênica do capsídeo e são agentes causais da doença aguda paralítica chamada poliomielite (FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2007; NUANUALSUWAN; CLIVER; 2002a)

A via de infecção é oral, através de água ou alimentos contaminados, sendo o vírus resistente à acidez estomacal (FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2007). O intestino delgado é um ambiente adequado para biossíntese e a eliminação viral via fecal ocorre, normalmente, por um período de até três meses, podendo durar anos em indivíduos imunocomprometidos (WHO; UNICEF, 2000; WOOD; SUTTER; DOWDLE, 2000).

Devido ao trabalho Global de Erradicação da poliomielite e intensivos programas de imunização, o vírus selvagem da poliomielite é, atualmente, endêmico somente em quatro países: Afeganistão, Paquistão, Índia e Nigéria (CDC, 2009).

Existem duas vacinas disponíveis para o controle da poliomielite. Na primeira, os sorotipos do vírus encontram-se atenuados (vacina Sabin OPV – Vacina Oral de Poliovírus), enquanto na segunda os sorotipos foram inativados por tratamento com formalina (vacina Salk IPV – Vacina Intramuscular de Poliovírus) e são administrados via intramuscular, conferindo proteção individual, o que encarece esta estratégia de vacinação quando comparada à vacina Sabin (WOOD; SUTTER; DOWDLE, 2000). Deste modo, países desenvolvidos como Estados Unidos da América e Finlândia utilizam vacina Salk, enquanto países em desenvolvimento preferem adotar a vacinação Sabin.

No Brasil, utiliza-se a vacina Sabin OPV. O indivíduo imunizado também elimina vírus atenuados (vacinais), que podem sobreviver ao processo de tratamento de esgoto (PUIG et al., 1994) e persistir no ambiente por vários meses (GERBA, 2005). Uma vez no ambiente, estão propensos a entrar em contato com indivíduos não vacinados, e

desta forma os imuniza por contato secundário, realizando a chamada “imunização de rebanho”. Essa estratégia de vacinação é visada por ter relativamente menos custos que a vacina Salk IPV e imunizar contatos secundários (WOOD; SUTTER; DOWDLE, 2000).

Entretanto, em indivíduo vacinado com OPV, os três sorotipos infectam o epitélio intestinal e replicam-se no intestino por um período variando entre algumas semanas a três meses. Durante esse período os poliovírus sofrem mudanças genéticas que podem resultar em mutações na reversão da atenuação, sendo que isso pode, mesmo que raramente, resultar em paralisia, ou seja, a chamada Poliomielite Paralítica Associada à Vacina (VAPP) (WHO, 2004; WOOD; SUTTER; DOWDLE, 2000).

A VAPP é preocupante na que concerne aos pacientes imunocomprometidos, pois o período de replicação viral no intestino destes indivíduos pode se prolongar por muitos anos, aumentando deste modo, a chance de ocorrerem mutações e rearranjos entre os sorotipos, revertendo a neurovirulência e adquirindo características do poliovírus selvagem. Em áreas erradicadas da poliomielite, a única fonte da doença é via VAPP, cuja taxa mundial é de 1 caso para cada 750.000 pessoas vacinadas (CDC, 1997).

Mesmo em pequena escala, esse vírus pode causar quadros clínicos severos e, por essa razão, é necessária uma vigilância ambiental sobre a potencial re-emergência da transmissão de poliovírus neurovirulentos na sociedade (ROIVAINEN et al., 2010).

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Estudar a incidência de vírus entéricos – adenovírus, enterovírus e poliovírus – em águas de mananciais através de técnicas moleculares e de cultivo celular, em amostras coletadas no município de Florianópolis/SC.

2.2. Objetivos Específicos

- Coletar, processar e extrair o material genético de amostras de água de superfície, coletadas mensalmente em locais previamente selecionados, na cidade de Florianópolis, SC;
- Estudar a presença e/ou infecciosidade de enterovírus e poliovírus nas amostras de água por técnicas moleculares e de cultivo celular;

- Estudar a presença e integridade de adenovírus humanos nas amostras de água por técnicas moleculares;
- Analisar a presença de bactérias indicadoras de contaminação fecal;
- Verificar o efeito da precipitação quanto à positividade de vírus entéricos nas amostras.

3. Metodologia

3.1. Coleta

Foram coletados, mensalmente, dois litros de água de cada um dos 6 pontos selecionados para avaliação de contaminação ambiental. Dois pontos de coleta são referentes à água de consumo humano e os outros 4 estão localizados no maior manancial de água potável de Santa Catarina, a Lagoa do Peri. A Lagoa do Peri tem sua água utilizada para captação e participa da Estação de Tratamento de Água do Sistema Costa Leste-Sul, abastecendo cerca de 110.000 habitantes de Florianópolis nos distritos da Barra da Lagoa, Lagoa da Conceição, Campeche, Morro das Pedras, Armação e Ribeirão da Ilha, além de estar localizada em uma localidade recreacional, visitada principalmente nos meses de verão por moradores e turistas (LAGO, 1996). As coletas dos pontos da Lagoa do Peri foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Ecologia de Águas Continentais liderado pelo Prof. Dr. Maurício Petrucio do Departamento de Ecologia e Zoologia da UFSC, que realiza outras análises das águas coletadas nesses pontos pré-selecionados. Os 4 pontos da Lagoa do Peri foram escolhidos pelo grupo do Prof. Petrucio por representarem diferentes microambientes da lagoa, com características peculiares. Os 6 pontos de coleta são assim definidos:

- Ponto 1: água captada de uma nascente, localizada no terreno das futuras dependências de uma escola no bairro Itacorubi em Florianópolis, que não recebe tratamento mas que é eventualmente consumida por alunos e professores durante atividades recreativas. Neste ponto as amostras foram coletadas de Fevereiro a Julho de 2011, totalizando 6 amostras (Figura 1);
- Ponto 2: água potável proveniente de uma Solução Alternativa de Abastecimento Coletivo (SAC) do bairro Saco Grande. A SAC

ACOLJOGOC (Associação Comunitária do Loteamento João Gonzaga da Costa) capta água de nascente, trata com pastilhas de Cloro e distribui para cerca de 1.380 pessoas. Neste ponto foram coletadas amostras de Fevereiro a Julho de 2011, totalizando 6 amostras (Figura 2);

- Ponto 3: água de manancial da Lagoa do Peri, localizado na área de recreação e captação de água para consumo humano. Neste ponto, foram coletadas amostras de Junho de 2010 a Maio de 2011, totalizando 12 amostras (Figura 3);
- Ponto 4: água de manancial da Lagoa do Peri, localizado no centro da lagoa (Figura 3). As amostras deste ponto foram coletadas de Junho de 2010 a Maio de 2011, totalizando 12 amostras;
- Ponto 5: água de manancial da Lagoa do Peri localizado próximo à desembocadura do Rio Cachoeira Grande, que é altamente conservado, com nenhuma residência em suas margens. Este ponto foi, portanto, considerado previamente como Ambiente Conservado (Figura 3) e também foram coletadas amostras de Junho de 2010 a Maio de 2011, totalizando 12 amostras;
- Ponto 6: água de manancial da Lagoa do Peri localizado próximo ao Rio Ribeirão Grande. Este rio recebe efluentes de casas de moradores tradicionais estabelecidos ao longo do rio, sendo por esse motivo considerado previamente como Ambiente Degradado (Figura 3). Neste ponto, foram coletadas amostras de Junho de 2010 a Maio de 2011, totalizando 12 amostras.



Figura 1. Local de coleta de água na propriedade da Escola. À esquerda, observa-se o ambiente onde está localizada a torneira (foto à direita), de onde a água é consumida e coletada (Fonte: Autora).

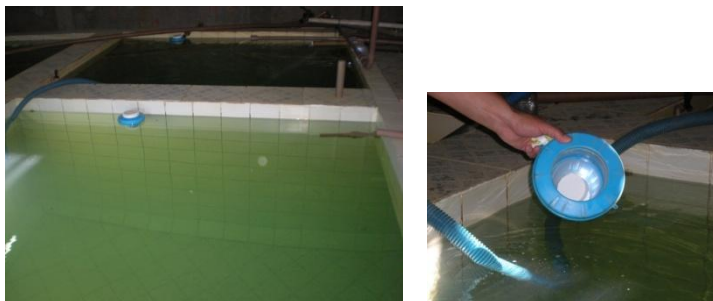


Figura 2. Local de coleta de água na Estação de tratamento de água da SAC ACOLJOGOC. À esquerda os tanques de armazenagem para tratamento da água e à direita demonstração do tratamento da água, realizado através de pastilhas de Cloro (Fonte: Autora).

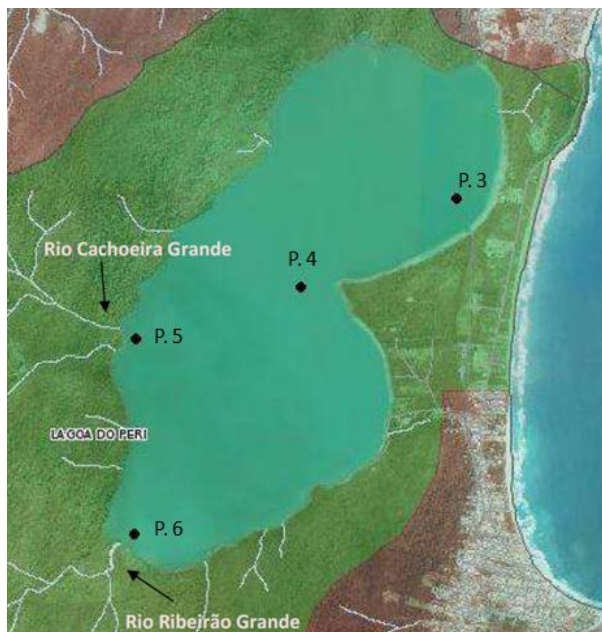


Figura 3. Localização dos pontos de coleta na Lagoa do Peri: P. 3 – Ponto de Captação de Água; P. 4 – Centro da Lagoa; P. 5 – Ambiente Conservado; P. 6 – Ambiente Degradado (Figura adaptada de Lisboa, 2009).

3.2. Índices pluviométricos

Os índices pluviométricos de todo o período de coletas foram coletados pela Estação Pluviométrica de Florianópolis, localizada no Bairro Itacorubi e gentilmente cedidos pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S. A. (EPAGRI). Foi realizado o Teste de Correlação de Pearson pelo *software* GraphPad Prism - 5, avaliando os parâmetros de precipitação, presença e quantificação viral de HAdV, com intervalo de confiança de 95%.

3.3. Análise de coliformes totais e *Escherichia coli*

Para as amostras de água de campo provenientes da SAC e da Escola, foi realizada a análise e quantificação de coliformes totais e *Escherichia coli*, correlacionando e avaliando-se os resultados obtidos com os preconizados pela Portaria MS 518/2004 para água potável (ANVISA, 2004). As amostras da Lagoa do Peri não foram analisadas devido ao fato de terem sido coletadas e processadas antes do início deste trabalho.

Na prática laboratorial, colocou-se 1 mL das amostras coletadas em contato com o kit 3M[®] Petrifilm *E. coli*/Coliform Count (EC) Plate sendo estes incubados em estufa a 37°C pelo período de 48 horas. Observações do crescimento de colônias vermelhas com gás (coliformes totais) ou colônias azuis com gás (*E. coli*) foram contabilizadas e os resultados expressos em Unidade Formadora de Colônia (UFC)/100 mL.

3.4. Concentração das amostras de água: Filtração em membrana negativa e reconcentração pelo método Centriprep[®]

A filtração das amostras de 2 L foi realizada por meio do método descrito por Katayama, Shimasaki e Ohgaki (2002), que consiste na filtração, concentração e eluição das amostras de água através de membrana carregada negativamente e reconcentradas pelo dispositivo Centriprep[®] YM50 (Millipore).

As amostras foram filtradas num sistema de vácuo com membrana negativamente carregada (Nihon Millipore) com 90 mm de diâmetro e 0,45 µm de porosidade, com um fluxo de 200 mL/min. Previamente à filtração, 25 mL de Cloreto de Magnésio (MgCl₂) 2M foram adicionados às amostras para que as partículas virais, naturalmente carregadas negativamente, fossem positivamente carregadas pela ação dos íons Mg²⁺, permitindo a retenção dessas partículas na membrana negativamente carregada durante o processo de filtração. A membrana foi então lavada com 350 mL de solução de

H₂SO₄ a 0,5 mM (pH 3,0) para assegurar a retenção das partículas virais na mesma. Em seguida a eluição viral foi realizada pela adição de 11 mL de NaOH a 1mM (pH 10,5), que ficou em contato com a membrana sob agitação por 10 minutos. A seguir, o eluato foi neutralizado com 50 µL de solução de H₂SO₄ a 50mM e 50 µL de tampão Tris-EDTA 100X a 1mM (pH 8,0).

A amostra final de cerca de 10 mL foi reconcentrada utilizando-se Centriprep® YM50 (Millipore), resultando em volume final de cerca de 4 mL, através de centrifugação a 1,500 Xg por 10 min a 4°C.

3.4.1. Estudo da recuperação viral

Para controle de todo o procedimento de concentração e detecção viral, mensalmente foram coletados 2 L adicionais de algum ponto de coleta selecionado aleatoriamente e inoculado o fluído viral de HAdV-2 com título viral infeccioso conhecido de $4,0 \times 10^7$ UFP/mL, disponível no Laboratório de Virologia Aplicada (UFSC), de modo que ao final do procedimento (concentração, extração do material genético e detecção por PCR quantitativo), fosse possível a determinação da taxa recuperação viral da metodologia, através da observação da quantidade de vírus adicionado previamente ao procedimento e a quantidade final recuperada.

3.5. Extração do material genético viral das amostras de águas concentradas

Após a concentração das amostras, o material genético viral foi extraído através do kit comercial RTP DNA/RNA Virus® Mini Kit II (Invitek), de acordo com as instruções do fabricante, onde a partir de um volume de 200 µL, procede-se à extração do material genético viral seja ele DNA ou RNA. Resumidamente, ao adicionar tampão e enzimas, a amostra tem seu material genético retido em uma membrana de sílica. Após sucessivas lavagens, os contaminantes foram removidos e o material genético purificado foi eluído em um volume final de 60 µL em tampão de eluição. O material foi então estocado à -80°C, a fim de evitar degradação dos ácidos nucleicos expostos.

3.6. Detecção de enterovírus por RT-PCR qualitativo

Por tratar-se de um grupo viral constituído de genoma RNA, as amostras foram submetidas primeiramente à reação de transcrição reversa (RT) com emprego de iniciadores randômicos para síntese do DNA complementar (cDNA). Para isto, 5 µL de RNA não diluído foram desnaturados a 99°C por 5 minutos e resfriados em gelo por dois

minutos. Em seguida, o material genético foi diluído 1:10 em água DEPC para evitar inibição da reação devido a componentes presentes na matiz ambiental e os 5 µL diluídos então foram adicionados à mistura da reação, que continha 20 pmoles de iniciador randômico (Promega), 0,6 mM de cada dNTP, 100 U da enzima transcriptase reversa (MMLV-Promega), 20 U de inibidor de RNase (RNasin-Promega), resultando em volume final de 25 µL. A reação de transcrição reversa foi realizada a 37°C por 60 min em aparelho termociclador.

Obtido o cDNA, partiu-se para a reação de amplificação do material genético por meio da técnica de Reação da Cadeia da Polimerase (PCR), realizada a partir do protocolo descrito por Atmar et al. (1993). Os iniciadores utilizados Polio-F (5'-ACGGACACCCAAAGTA – 3') e Polio-R (5'-AGCACTTCTGTTTCCC – 3') amplificam uma região não codificante de 394 pb do genoma viral do grupo dos enterovírus. Foram adicionados 5 µL do cDNA sintetizado à mistura de reação, que continha 20 pmoles de cada iniciador, MgCl₂ a 25 mM, dNTP a 10 mM e 1U de Taq DNA Polimerase, em volume final de 25 µL. A PCR ocorreu a partir de uma etapa de desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 55°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min, seguido de um passo a 72°C por 7 min para permitir uma etapa de extensão final do produto gênico amplificado.

O produto amplificado foi visualizado por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 1X (Tris-HCl 0,09M; Ácido Bórico 0,09M e EDTA 0,002M), com aplicação do padrão de peso molecular 100 pb (Invitrogen *Life Technologies*) e corado com Gel Red (BioAmerica). Os produtos foram visualizados sob luz UV em Fotodocumentador (MiniBIS Pro 16mm, BioAmerica).

Em todas as reações foi utilizado como controle positivo o material genético extraído da suspensão viral estoque de poliovírus vacinal tipo 2, e como controle negativo a reação contendo todos os reagentes, sem aplicação de material genético.

3.7. Cultivo e manutenção das linhagens celulares

Para os experimentos de viabilidade viral nas amostras ambientais e experimentos envolvendo a produção dos estoques virais de poliovírus, foram utilizadas as seguintes linhagens celulares: a

linhagem RD¹, que são células derivadas de rabdomiosarcoma humano, permissivas a 99% dos enterovírus; a linhagem L20b¹, que são células de rato geneticamente modificadas para expressar o receptor para poliovírus, sendo por este motivo altamente seletivas à infecção e replicação por este vírus (WHO, 2004) e a linhagem Vero, derivada de rim de macaco verde da África, também suscetível à infecção por poliovírus.

O cultivo de crescimento das células RD, foi realizado em garrafas de 75 cm² com Meio Dulbecco Mínimo Essencial com sais de Eagle (DMEM) (Gibco), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco), 1% de antibióticos PSA [(penicilina G (100U/mL), sulfato de estreptomicina (100µg/mL) e anfotericina B (0,025µg/mL)] (Cultilab). Enquanto para as células L20b, foram utilizadas as mesmas garrafas, porém com Meio Leibowitz L-15, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco), 1% de antibióticos PSA, 1% de L-Glutamina e 1% de HEPES 1M. A linhagem Vero, por sua vez, foi cultivada nas mesmas garrafas referidas, contendo Meio Mínimo Essencial com sais de Eagle's (MEM) (Sigma) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco) e 1% de antibióticos PSA.

Em condições de manutenção, ou seja, quando as células estão sob infecção viral, segue-se a mesma composição do meio de cultura para linhagem celular RD. Para linhagem Vero e L20b, a concentração do soro fetal bovino é alterada para 2% e 5%, respectivamente.

As células foram sempre mantidas em condições padrão a 37°C e em atmosfera de 5% de CO₂.

3.8. Produção das suspensões virais de poliovírus vacinal sorotipo 2

As células Vero, foram cultivadas em meio de crescimento conforme descrito no item 3.7. Após atingirem confluência, as células foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) (pH 7,2) e receberam 1 mL do inóculo de poliovírus vacinal sorotipo 2 não quantificado disponível no Laboratório de Virologia Aplicada. Após uma hora de incubação para adsorção viral sob condições padrão, e agitação em intervalos de 15 minutos, adicionou-se meio manutenção, conforme descrito no item 3.7.

¹ Estas linhagens celulares foram gentilmente cedidas pela Dra. Eliane Veiga da Costa, do Laboratório de Enterovírus da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, a quem agradecemos a importante colaboração.

Diariamente, as células foram observadas em microscópio invertido até apresentarem 100% de efeito citopático (ECP) (Figura 4), caracterizado por células arredondadas e até mesmo, seu desprendimento da superfície, desagregando-se da monocamada celular. As células foram então congeladas a -80°C e descongeladas a 37°C por três vezes para que fossem lisadas e liberassem os vírus que ainda estivessem intracelulares. Após, a suspensão viral foi transferida para um tubo e centrifugada a 350 Xg por 20 minutos a 4°C para remoção das células lisadas. O sobrenadante foi utilizado para realizar novas infecções, com objetivo de aumentar o título viral. Após algumas passagens, com a observação da redução do período necessário para o início do aparecimento do efeito citopático, caracterizando assim o aumento do título viral, o fluido viral foi titulado, aliquotado e estocado a -80°C .

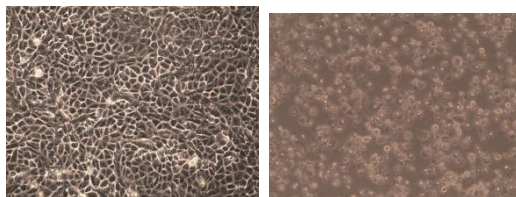


Figura 4. Demonstração do efeito citopático do poliovírus vacinal sorotipo 2 em células Vero. À esquerda, o controle celular. À direita, células infectadas com 24h de infecção, apresentando 100% de ECP. Aumento 100X.

3.9. Titulação da suspensão viral de poliovírus vacinal sorotipo 2

Células Vero foram cultivadas com meio de crescimento, conforme item 3.7 em placas de 24 poços na concentração de $3,0 \times 10^5$ células/mL por 24 h até atingirem confluência. Quando isso ocorreu, o meio de crescimento foi aspirado e cada poço lavado duas vezes com PBS e então adicionou-se, em triplicatas, 250 μL da suspensão viral, seriadamente diluídas de 10^{-1} a 10^{-7} em MEM com 1% de PSA em cada poço, com exceção do controle celular, onde adicionou-se somente MEM com 1% de PSA. Após uma hora sob condições padrão, o inóculo foi removido e cada poço lavado com PBS. Em seguida, adicionou-se, por poço, 1 mL da solução aquosa de carboximetilcelulose (CMC) a 1,5% e solução MEM 2X, suplementado com MgCl_2 25 mM e PSA 1%, na proporção 1:1.

Após 48 horas sob condições padrão, o meio foi aspirado e as células fixadas e coradas com a adição de 250 μL do corante preto de

naftaleno 0,1% (Sigma), por 20 min a 37°C, sob agitação. Após o corante ser aspirado, as placas foram secas e o número de unidades formadoras de placas (UFP)/mL da maior diluição e o título viral foi calculado pela seguinte fórmula:

| |
|---|
| $\frac{\text{Média da triplicata} \times \text{Recíproca da diluição}}{\text{Recíproca do volume em mL}}$ |
|---|

3.10. Ensaio de citotoxicidade em cultura celular das amostras de água concentradas

Para realizar o ensaio de citotoxicidade foram utilizadas amostras previamente negativas para enterovírus pela técnica de RT-PCR. A linhagem celular RD foi cultivada na concentração de $3,0 \times 10^5$ células/mL em placas de cultura celular de 24 poços por 24 h até atingir confluência, quando então foram lavadas com PBS e inoculadas com 250 µL das amostras puras ou diluídas (1:2 e 1:4) em meio de cultura. Após a inoculação, as células foram mantidas a 37°C e 5% de CO₂ por uma hora e em seguida as amostras foram aspiradas e os meios de cultura de manutenção adicionados às células.

A cada 24 h, por um período de 7 dias, realizou-se observações em microscópio invertido, sendo comparadas com o controle celular contendo apenas o meio de cultura, para verificar possíveis alterações citológicas. Para confirmar as observações, após o período de incubação, os meios de cultivos foram aspirados e cada poço foi corado com a adição de 250 µL do corante preto de naftaleno 0,1% (Sigma), permitindo a melhor observação dos danos provocados ao tapete celular, determinando assim, em qual diluição cada tipo de amostras ambiental seria utilizada frente às células da linhagem RD.

3.11. Cultivo de células para detecção de enterovírus e poliovírus viáveis

Foram seguidos os procedimentos do Laboratório de Enterovírus da Fiocruz, que segue as diretrizes da Organização Mundial da Saúde, por ser este um Laboratório Nacional de Vigilância Epidemiológica da Poliomielite e uma referência nacional e internacional para o tema.

Conforme diretrizes da WHO (2003), uma pequena quantidade de poliovírus contaminante de uma amostra ambiental pode não ser capaz de se replicar de forma eficiente em linhagem celular L20b após a primeira inoculação nestas células, podendo não produzir um efeito citopático (ECP) característico. Entretanto, se a primeira passagem ocorrer em células RD, os mesmos se replicam e produzem ECP

característico, sendo possível uma segunda passagem para células L20b que confirmará ou não a presença de poliovírus viáveis na amostra.

Foram escolhidas as amostras provenientes dos pontos de coleta da Escola, SAC e captação de água da Lagoa do Peri para o ensaio de viabilidade de enterovírus, visto que são esses os pontos que entram em contato com a população, através da ingestão da água ou por recreação. Para tanto, as amostras que apresentaram resultado positivo no RT-PCR para enterovírus foram inoculadas, primeiramente, em linhagem celular RD, que pode ou não produzir ECP. Quando não observado ECP, foi realizada uma segunda passagem em linhagem RD, visto que não se pode chegar a nenhuma conclusão com menos de 14 dias de análise. Entretanto, quando observado ECP, seja na primeira ou segunda passagem em RD, foi realizada outra passagem para linhagem celular L20b, que ao observar ECP nestas, considerou-se amostra positiva para enterovírus e poliovírus viáveis. Porém, se não houve visualização de ECP na linhagem L20b, a amostra foi considerada negativa para poliovírus viáveis, porém positiva para enterovírus não-pólio (Figura 5) (WHO, 2004).

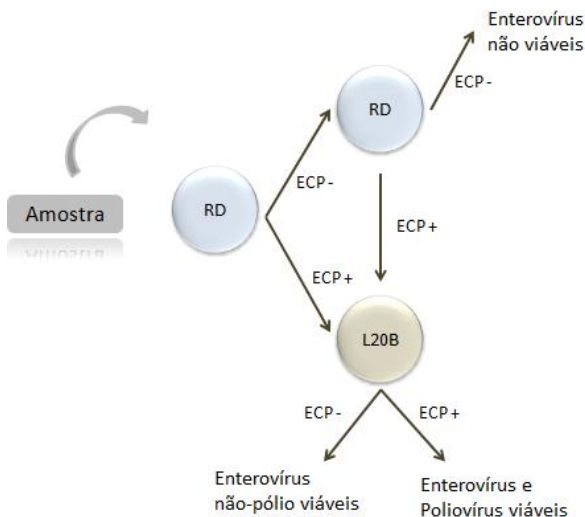


Figura 5. Representação esquemática das passagens em cultura celular para detecção de enterovírus e poliovírus viáveis presentes nas amostras. Não visualização de efeito citopático (ECP-); Visualização de efeito citopático (ECP+). RD: linhagem celular de rhabdomyosarcoma humano. L20b: células de rato geneticamente modificadas com receptor humano de poliovírus.

Para isto, a linhagem RD foi cultivada em garrafas de 25 cm² com meio de crescimento conforme item 3.7. Após atingirem confluência, as células foram lavadas com PBS e então infectadas com 500 µL das amostras na diluição testada no ensaio de citotoxicidade e mantidas pelo período de 1 h, em condições padrão para que ocorra a adsorção viral e em seguida, foi adicionado meio de manutenção. A cada 24 h, e por um período de 7 dias, foi monitorado o aparecimento de ECP, através de observação em microscópio invertido.

Após 7 dias, havendo ou não ECP, as garrafas foram congeladas a -80°C e descongeladas a 37°C por três vezes para que as células fossem lisadas e liberassem possíveis vírus que ainda estivessem intracelulares. Após, a suspensão viral foi transferida para um tubo e centrifugada a 350 Xg por 20 min a 4°C para remoção dos restos celulares.

Se não houve observação de ECP em linhagem RD, 500 µL do sobrenadante centrifugado foram utilizados para nova passagem em linhagem RD, conforme já descrito. Porém, se houve ECP, utilizou-se a linhagem L20b previamente cultivada em placas de 24 poços na concentração de $3,0 \times 10^5$ células/mL com meio de crescimento (conforme item 3.7). Quando a monocamada se tornou confluenta, foi lavada com PBS, e 250 µL do sobrenadante centrifugado foram inoculados por poço em triplicata e mantidos por 1 h em condições padrão. Após, foi adicionado 1 mL de meio de manutenção e a cada 24 h, e por um período de 7 dias, foi monitorado o aparecimento de ECP, através de observação em microscópio invertido.

Em todo o procedimento, foi utilizado como controle positivo o estoque viral de poliovírus vacinal sorotipo 2 previamente produzido, que foi inoculado em cada linhagem celular a ser trabalhada, assim como foi utilizado controle celular, com células mantidas com meio de cultura sob as mesmas condições.

3.12. Detecção e quantificação de adenovírus humanos por PCR quantitativo (qPCR)

Para a detecção e quantificação do número de cópias genômicas de adenovírus humanos, realizou-se PCR quantitativo, utilizando-se o Kit Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Este kit contém a maioria dos reativos da reação, como enzima Taq DNA Polimerase, oligonucleotídeos e condições salinas adequadas. Ao kit foram adicionados a sonda TaqMan e os iniciadores (Quadro 1) que amplificam uma sequência do gene *hexon* que codifica para uma proteína do capsídeo viral, extremamente conservada, presente em todos

os sorotipos, de acordo com o protocolo descrito por Hernroth et al. (2002).

Quadro 1. Iniciadores e sondas utilizados para quantificação em cópias genômicas de HAdV (Hernroth et al., 2002).

| Iniciadores e Sonda | Sequência |
|---------------------|---|
| HAdV F | C(AT)TACATGCACATC(GT)C(CG)GG |
| HAdV R | C(AG)CGGGC(GA)AA(CT)TGCACCAG |
| HAdV P | 6-FAM– CCGGGCTCAGGTACTCCGAGGCGTCCT- TAMRA |

6-FAM, fluoróforo 6-carboxifluoresceína; TAMRA, *quencher* não fluorescente na região 3' carboxitetrametilrodamina

Em volume final de 25 µL, os iniciadores senso (HAdV F) e anti-senso (HAdV R) foram adicionados à 12,5 µL de Master Mix na concentração final de 0,9 µM e sonda TaqMan (HAdV P) na concentração final de 0,225 µM, contendo 10 µL de amostra diluída 1:10 em água DEPC para evitar inibição. A amplificação foi realizada com uma etapa inicial de 2 min a 50°C e 10 min a 95°C, que corresponde à ativação e inativação respectivamente da enzima Uracil-DNA-glicosilase (UDG) que serve como um controle de contaminação por DNA previamente presente na amostra antes da amplificação, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s de desnaturação e 60°C por 1 min de anelamento.

Todas as reações foram realizadas em placas de 96 cavidades (MicroAmp Applied Biosystems) em aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems), sendo todas as amostras analisadas em duplicata, na presença de controles negativos (sem adição da ácido nucleico) e utilizando DNA padrão clonado em plasmídeo, com as sequências-alvo do vírus utilizado, disponível no Laboratório de Virologia Aplicada.

3.13. Teste da integridade de adenovírus por tratamento com DNase I

Foram escolhidas as amostras provenientes dos pontos de coleta da Escola, SAC e captação de água da Lagoa do Peri para o teste de integridade de adenovírus, pelo mesmo motivo descrito acima, já que

são esses os pontos que entram em contato com a população, através da ingestão da água ou por recreação.

Para este ensaio, as amostras que apresentaram resultado positivo para adenovírus humano (HAdV) pela técnica de qPCR, foram submetidas ao tratamento com DNase I para inferir sobre a presença de partículas virais íntegras, conforme descrito por Viancelli et al. (2011), com algumas modificações.

Com o objetivo de verificar os potenciais inibidores da atividade da enzima DNase I presentes na matriz amostral, antes do teste de DNase nas amostras, $2,0 \times 10^5$ UFP/mL de adenovírus humano-2 (HAdV-2) previamente inativado por 1 hora a 99°C e 30 minutos sob radiação ultravioleta, foi adicionado em uma amostra concentrada (previamente negativa para HAdV-2) e em água livre de nucleases, como controle da reação. Todas as reações enzimáticas foram realizadas utilizando 1 U de DNase I (o suficiente para degradar 100% do DNA adicionado), 1X tampão da enzima, 180 µL de água livre de nuclease ou amostra concentrada e incubadas por 15 min a temperatura ambiente. Esta etapa tem por objetivo degradar o material genético livre, desprovido de capsídeo (vírus defectivos). A enzima foi inativada com 25 mM EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) seguido de incubação por 10 min a 65°C. A seguir os ácidos nucleicos foram extraídos, conforme descrito no item 3.5, e realizado qPCR conforme item 3.12.

Obtido o resultado do teste de inibidores para enzima DNase I, seguiu-se para o tratamento das amostras. Para isso, uma reação contendo 180 µL de amostra de água concentrada, tampão de enzima 1x e 1 U de DNase I (Sigma) foi incubada por 15 min a temperatura ambiente. A enzima foi então inativada com 25 mM EDTA, seguido de incubação por 10 minutos a 65°C. As amostras tratadas foram submetidas à extração de ácidos nucleicos, conforme descrito no item 3.5, e qPCR conforme item 3.12.

4. Resultados

4.1. Coliformes totais e *Escherichia coli*

Na análise de coliformes totais e *Escherichia coli* realizadas na Escola e SAC, pode-se observar que somente na coleta do mês de Maio de 2011 da Escola foi encontrada 1 colônia de *E. coli* e 1 colônia de coliformes totais, o que significa 100 Unidades Formadoras de Colônia/100 mL, tanto para *E. coli* quanto para coliformes totais.

4.2. Citotoxicidade das amostras em linhagem celular RD

O estudo da citotoxicidade das amostras frente à linhagem celular RD está demonstrado na Figura 6. Pode-se observar que somente as amostras puras provenientes da Lagoa do Peri e da Escola são citotóxicas, pois apresentaram danos ao tapete celular, enquanto a amostra pura da SAC não se apresentou citotóxica. Decidiu-se portanto padronizar-se o emprego da diluição 1:2 para todas as amostras.

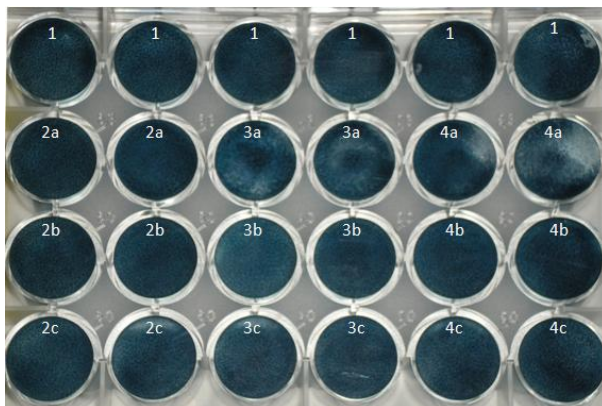


Figura 6. Citotoxicidade das amostras de água previamente negativas para PV em linhagem celular RD. Legenda: 1- Controle celular; 2- Amostra da SAC; 3- Amostra da Escola; 4- Amostra da Lagoa do Peri; a- amostra pura; b- amostra diluída 1:2; c- amostra diluída 1:4.

4.3. RT-PCR para detecção de enterovírus

Após concentração e extração de material genético, as amostras foram submetidas à reação de RT-PCR para detecção de enterovírus. O aparecimento de um fragmento amplificado com tamanho de 394 pb permitiu a determinação das amostras positivas para enterovírus. O controle positivo de todos os experimentos de RT-PCR foi o próprio genoma do fluido viral, previamente titulado por ensaio de unidades formadoras de placa de lise UFP ($4,7 \times 10^7$ UFP/mL).

De um total de 60 amostras, 24 (40% de positividade) apresentaram resultado positivo. Especificamente, no ponto de coleta da SAC e Escola, 100% (6/6) e 83% (5/6) das amostras apresentaram resultado positivo para enterovírus, respectivamente (Tabela 1). Quanto à Lagoa do Peri, 27% das amostras apresentaram resultado positivo: 50% no Centro da Lagoa, 16,7% no Ambiente Conservado e Degradado e 25% no ponto de Captação de Água (Tabela 2).

4.4. Detecção de enterovírus e poliovírus viáveis

As 14 amostras que apresentaram resultado positivo no ensaio de RT-PCR para enterovírus dos pontos de coleta da SAC, Escola e Captação de Água da Lagoa do Peri foram submetidas à cultura celular para detecção de enterovírus e poliovírus viáveis.

Após 7 dias da primeira passagem das amostras em RD, 11 amostras demonstraram efeitos citopáticos (ECP) (Figura 7). As 3 amostras restantes que não apresentaram ECP foram submetidas a uma segunda passagem em RD, que desta vez confirmaram a presença de enterovírus viáveis, ao apresentarem ECP. Portanto, em todas as amostras testadas e positivas no RT-PCR, foi confirmada a presença de enterovírus viáveis.

Estas amostras foram então, inoculadas em linhagem celular L20b para confirmação de poliovírus viáveis. Entretanto, o período de incubação de 7 dias necessários para visualização de ECP, nenhuma amostra foi positiva (Figura 8). Este fato evidencia que o ECP visualizado em linhagem RD era proveniente de enterovírus não-pólio.



Figura 7. Demonstração do efeito citopático de enterovírus em linhagem celular RD após 7 dias de incubação. A - Controle celular; B – Tapete celular infectado com amostra do mês de Maio coletada na Escola; C – Controle positivo infectado com poliovírus vacinal tipo 2. Aumento de 40X.



Figura 8. Demonstração do efeito citopático de poliovírus em linhagem celular L20b após 7 dias de incubação. A - Controle celular; B – Tapete celular infectado com amostra do mês de Julho coletada na Escola; C – Controle positivo infectado com poliovírus vacinal tipo 2. Aumento de 100X.

As tabelas 1 e 2 mostram os resultados obtidos nos ensaios de detecção por metodologia molecular (RT-PCR) e de viabilidade de enterovírus e poliovírus em cultura celular RD e L20b na SAC e Escola e Lagoa do Peri.

Tabela 1. Detecção e ensaios de viabilidade de enterovírus e poliovírus nas amostras coletadas na SAC e na Escola, no período de Fevereiro a Julho de 2011.

| Mês da Coleta | RT-PCR entero (100%) | SAC Enterovírus viáveis (100%) | Polio viáveis (0%) | RT-PCR entero (83%) | Escola Enterovírus viáveis (83%) | Polio viáveis (0%) |
|---------------|----------------------------|---|--------------------------|---------------------------|---|--------------------------|
| fev/11 | + | + | - | + | + | - |
| mar/11 | + | + | - | + | + | - |
| abr/11 | + | + | - | + | + | - |
| mai/11 | + | + | - | + | + | - |
| jun/11 | + | + | - | - | * | * |
| jul/11 | + | + | - | + | + | - |
| Total | 6/6 | 6/6 | 0/6 | 5/6 | 5/5 | 0/5 |

O símbolo (+) representa resultado positivo, o símbolo (-) o resultado negativo e o símbolo (*) onde não se aplica.

Tabela 2. Detecção e ensaios de viabilidade de enterovírus e poliovírus nas amostras coletadas nos quatro pontos da Lagoa do Peri, no período de Junho de 2010 a Maio de 2011.

| Mês da Coleta | Centro da Lagoa (50%) | Ambiente Conservado (16,7%) | Ambiente Degradado (16,7%) | Captação de água | | |
|---------------|-----------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------|---------------------------|-------------------------|
| | | | | RT-PCR entero (25%) | Enterovírus viáveis (25%) | Poliovírus viáveis (0%) |
| jun/10 | + | - | + | - | * | * |
| jul/10 | + | - | + | + | + | - |
| ago/10 | + | + | - | + | + | - |
| set/10 | + | - | - | - | * | * |
| out/10 | + | - | - | - | * | * |
| nov/10 | - | - | - | - | * | * |
| dez/10 | - | - | - | - | * | * |
| jan/11 | - | - | - | + | + | - |
| fev/11 | + | + | - | - | * | * |
| mar/11 | - | - | - | - | * | * |
| abr/11 | - | - | - | - | * | * |
| mai/11 | - | - | - | - | * | * |
| Total | 6/12 | 2/12 | 2/12 | 3/12 | 3/3 | 0/3 |

O símbolo (+) representa resultado positivo, o símbolo (-) o resultado negativo e o símbolo (*) onde não se aplica.

4.5. Recuperação viral e qPCR para detecção e quantificação de adenovírus humanos

A recuperação viral da amostra de água semeada com HAdV-2 concentrada pela metodologia de Katayama, Shimasaki e Ohgaki (2002), submetida à extração de ácidos nucleicos e à reação de qPCR foi de 10%. Demonstrando assim que, apesar da baixa taxa de recuperação, esta técnica foi capaz de concentrar os possíveis vírus presentes nas amostras ambientais.

Das 60 amostras coletadas, somente 3 apresentaram resultado negativo para HAdV, o que representa 95% de positividade, com média de $2,93 \times 10^7$ cg/L e intervalos de menor e maior valor de $1,70 \times 10^6$ e $2,41 \times 10^8$ cg/L, ambos registrados na Lagoa do Peri, no Ambiente Conservado e Degradado, respectivamente.

A mediana, intervalo, primeiro (25%) e terceiro (75%) quartis do período de amostragem para cada ponto estão apresentados na Figura 9.

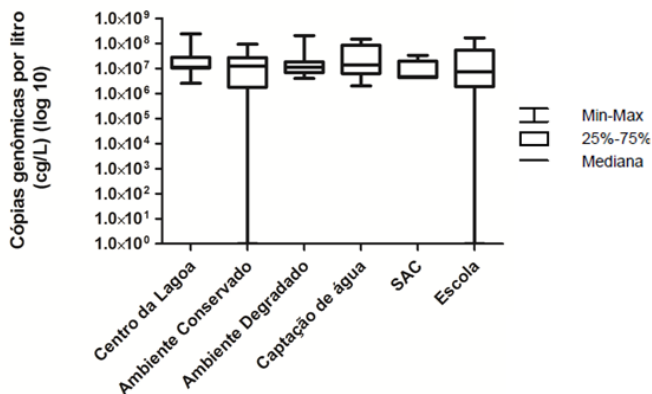


Figura 9. Gráfico Box-Plot apresentando a mediana, intervalo, primeiro (25%) e terceiro (75%) quartis em cópias genômicas por litro (cg/L) de HAdV detectado em ensaio de qPCR em amostras de água coletadas na Lagoa do Peri (Centro de Lagoa, Ambiente Conservado, Ambiente Degradoado, Captação de água), SAC e Escola, referente ao período de amostragem.

A Figura 10 mostra o número de cópias genômicas de adenovírus humano detectado nos quatro pontos da Lagoa do Peri, durante todo o período de coleta. Nota-se que em Julho e Novembro de 2010, não foi detectado HAdV no Ambiente Conservado. Quanto às coletas realizadas na SAC e Escola, o número de cópias genômicas pode ser visualizado na Figura 11, onde também se percebe a ausência do vírus na coleta do mês Julho de 2011 da Escola.

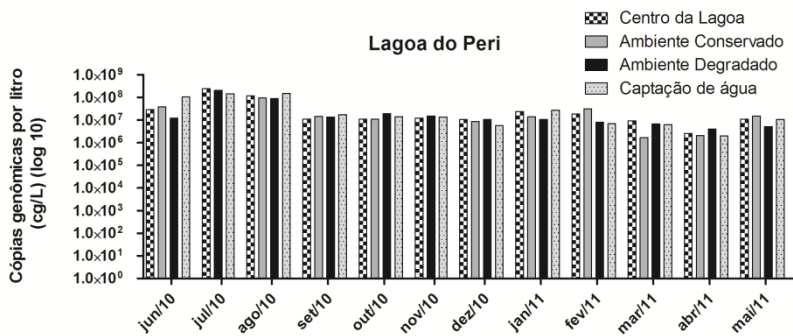


Figura 10. Número de cópias genômicas por litro (cg/L) de HAdV detectado em ensaio de qPCR em amostras de água coletadas na Lagoa do Peri no período de junho de 2010 a maio de 2011.

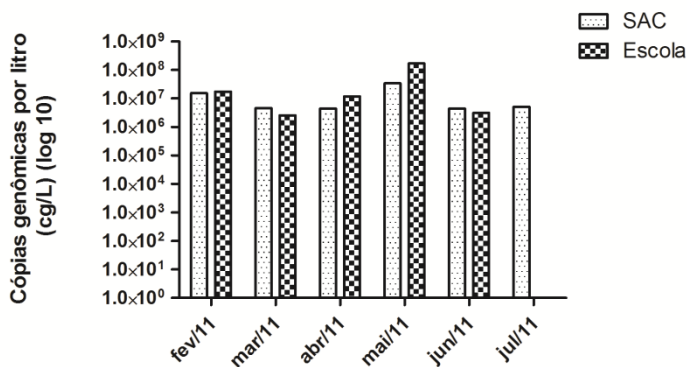


Figura 11. Número de cópias genômicas por litro (cg/L) de HAdV detectado em ensaio de qPCR em amostras de água coletadas na Escola e SAC no período de fevereiro de 2011 a julho de 2011.

4.6. Teste da integridade de adenovírus através de tratamento com DNase I

O teste de inibição da enzima DNase I revelou que a amostra concentrada não contém inibidores que interferem na atividade da enzima, visto que os resultados de logaritmo obtidos com HAdV-2 inativado semeado na amostra concentrada e em água livre de nucleases foram os mesmos (Tabela 3).

Tabela 3. Logaritmo da quantificação de genomas de $4,0 \times 10^5$ pfu/mL de HAdV-2 inativado, inoculado em água livre de nucleases e em amostra concentrada seguido de tratamento com DNase I.

| HAdV inativado inoculado | HAdV (log 10) DNase I (U) | |
|-----------------------------|------------------------------|--------|
| | 1,0 | 0,0 |
| Amostra concentrada | 10^3 | 10^8 |
| Água livre de nucleases | 10^3 | 10^8 |

Obtido esse resultado, seguiu-se com o tratamento enzimático de todas as amostras concentradas que apresentaram resultado positivo para HAdV no ensaio de qPCR, dos pontos de coleta da SAC, Escola e Captação de Água na Lagoa do Peri com DNase I, seguido de extração de ácidos nucleicos e realização de qPCR.

Em 26% das amostras, o tratamento enzimático com DNase I demonstrou a presença de somente partículas virais não íntegras nas

amostras coletadas em Março e Maio de 2011 da Lagoa do Peri, de Junho e Julho da Escola e Março, Abril e Junho da SAC. Por outro lado, 17% das amostras não apresentaram redução de logaritmo (amostra coletada em Dezembro de 2010, Fevereiro e Abril de 2011 da Lagoa do Peri e amostra coletada em Março de 2011 da Escola) e outras 39% apresentaram redução de somente 1 logaritmo, o que corresponde a 90% de diminuição do genoma do HAdV em relação a amostra não tratada com DNase I. Nas amostras em que se observou redução de 2 e 3 logaritmos, compreendem 9% cada do total de amostras testadas (99 e 99,9% de redução da presença do genoma, respectivamente) (Figuras 12, 13 e 14).

As figuras a seguir, 12, 13 e 14, apresentam os resultados do ensaio de integridade de adenovírus humano correlacionado com a média de precipitação (mm) dos 7 dias que antecederam as coletas, a fim de permitir uma possível associação entre a contaminação viral e a ocorrência de chuvas previamente às coletas (dados gentilmente cedidos pela EPAGRI S. A.). Deste modo, não foi observada uma correlação significativa pelo Teste de Correlação de Pearson entre a precipitação e os valores de cópias genômicas de HAdV ($P>0,005$).

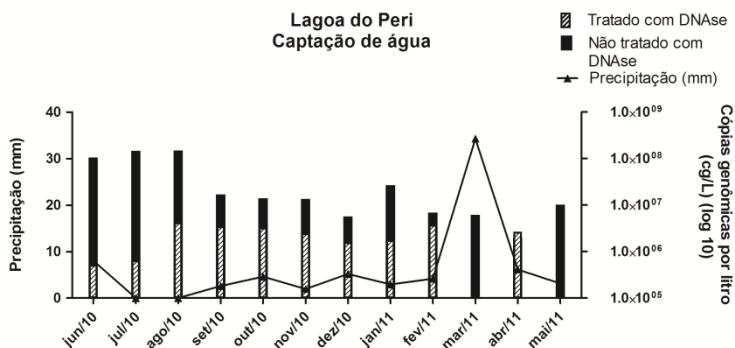


Figura 12. Número de cópias genômicas por litro (cg/L) de HAdV detectados nos ensaios de qPCR e qPCR precedido de tratamento enzimático com DNase I nas amostras do ponto de Captação de Água na Lagoa do Peri, coletadas de Junho de 2010 a Maio de 2011 e média da precipitação dos 7 dias que antecederam as coletas.

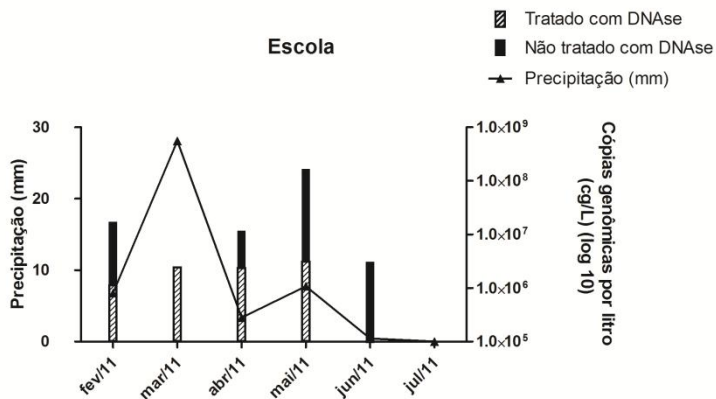


Figura 13. Número de cópias genômicas por litro (cg/L) de HAeV detectados nos ensaios de qPCR e qPCR precedido de tratamento enzimático com DNase I nas amostras do ponto de coleta na Escola, coletadas de Fevereiro a Julho de 2011 e média da precipitação dos 7 dias que antecederam as coletas.

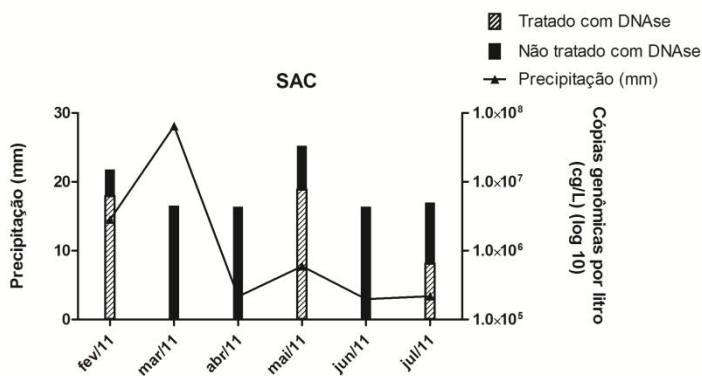


Figura 14. Número de cópias genômicas por litro (cg/L) de HAeV detectados nos ensaios de qPCR e qPCR precedido de tratamento enzimático com DNase I nas amostras do ponto de coleta na SAC, coletadas de Fevereiro a Julho de 2011 e média da precipitação dos 7 dias que antecederam as coletas.

5. Discussão

As nascentes e lagoas de água doce apresentam uma interface biológica entre humanos e diversos organismos, servindo como habitat para interações ecológicas assim como um meio de transmissão de vírus entéricos para humanos, principalmente quando esta água recebe de

alguma forma dejetos humanos de origem fecal e é utilizada para o consumo humano sem tratamento ou com tratamento ineficiente.

A cidade de Florianópolis possui somente 44% de cobertura de coleta e tratamento de esgotamento sanitário (PMISB, 2009) e, além disso, durante os meses de verão, recebe influxo de turistas que aumenta em muito o número da população, multiplicando deste modo também a carga de esgoto lançada diretamente nas águas de superfície, comprometendo desta forma os recursos hídricos.

Em Florianópolis, estudos desenvolvidos por Moresco et al. (2011) e Rigotto (2009) envolvendo a análise de água do mar, demonstraram a presença de adenovírus humano em 55% e 64,2% das amostras coletadas e vírus da hepatite A em 51,5% e 8,3% das amostras, respectivamente. As metodologias utilizadas podem ter sido um fator importante na diferença de positividade das amostras, principalmente para o vírus da hepatite A, visto que Moresco et al. (2001) concentrou as amostras pelo método de floculação orgânica, descrito por Calgua et al. (2008), enquanto Rigotto (2009) realizou o método de adsorção/eluição descrito por Katayama, Shimasaki e Ohgaki (2002). Entretanto, da mesma forma, estes índices retratam a contaminação por dejetos humanos de origem fecal em águas utilizadas para recreação e cultivo de moluscos do município. Quanto à pesquisa de vírus entéricos em água de consumo humano em Florianópolis, Rigotto et al. (2010) e Victoria et al. (2010) detectaram rotavírus, adenovírus humano, vírus da hepatite A e norovírus nas amostras analisadas.

De modo geral, os vírus entéricos, têm sido encontrados em águas de mananciais utilizadas para consumo humano em diversos países. Lodder et al. (2010) encontrou positividade em 75% de suas amostras para enterovírus na Holanda, Albinana-Gimenez et al. (2009) teve 11% de suas amostras de água pós-tratadas com cloração positivas para HAdV na Espanha, Payment, Trudel e Plante (1985) detectaram enterovírus após tratamento de água para consumo humano no Canadá e Van Heerden et al. (2003) teve 4,41% de suas amostras positivas para HAdV em água tratada para consumo humano na África do Sul.

Conhecendo a capacidade de resistência que os vírus têm no ambiente aquático já relatada em diversos estudos (CALGUA et al., 2008; FONG; LIPP, 2005; GIRONES et al., 2010; ENRIQUEZ; HURST; GERBA, 1995; McFETERS et al., 1974; OKOH; SIBANDA; GUSHA, 2010; PAYMENT ; TRUDEL; PLANTE, 1985; PINA et al., 1998; WYN-JONES; SELLWOOD, 2001), é esperado que eles sejam detectados por longos períodos nas condições ambientais. O presente estudo corrobora com esses dados, pois adenovírus humanos e

enterovírus foram encontrados em todos os pontos de coleta ao longo de todo o período de análise, com uma incidência de 95% e 40% de amostras positivas, respectivamente. Isto sugere que as águas de mananciais de Florianópolis estão recebendo dejetos humanos intermitentemente e que o ambiente de água doce não conteria substâncias prejudiciais aos vírus entéricos, principalmente aos adenovírus humanos.

A Lagoa do Peri, além de ser o maior hábitat de espécies de água doce de Florianópolis e participar do abastecimento de água potável, é também utilizada como área recreacional, recebendo cerca de 2 mil pessoas na temporada de veraneio (LAGO, 1996), concentrando-se no ponto de recreação que é próximo à área de Captação de Água. Também ao longo do rio Ribeirão Grande (rio Sertão), são praticadas atividades agrícolas de subsistência com caráter artesanal, em pequenas propriedades que raras vezes ultrapassam os 15 hectares. Boa parte dessas propriedades possui fossa com sumidouro, mas muitas se encontram próximas a canais e córregos, podendo vir a comprometer a qualidade da água do rio Ribeirão Grande, que drena uma área de 6,98 km² da Lagoa do Peri (LAPOLLI et al., 1990). Também, a proximidade de galinheiros e currais dos canais e córregos pode poluir as águas pela ausência de tratamento dos dejetos de origem animal (CARDOSO et al., 2008). Possivelmente, essas duas regiões, a área de recreação e a desembocadura do rio Ribeirão Grande, são as responsáveis por alimentar a contaminação da Lagoa do Peri com dejetos humanos não tratados, o que reflete na positividade de amostras quanto aos vírus analisados.

Em estudos prévios realizados na Lagoa do Peri, Silva (2000) e Simonassi (2001) classificam a lagoa como homogênea em toda sua extensão, principalmente devido à ação do vento e homogênea também em sua coluna d'água. Deste modo, podemos inferir que a contaminação viral decorrente das regiões acima descritas é também homogeneizada, e por isso presente em todos os quatro pontos de coleta da Lagoa do Peri (Tabela 3 e Figura 10).

Quanto à grande positividade de HAdV nas amostras ao longo de todo o período de coleta, inclusive na Lagoa do Peri, Pina et al. (1998) já descreveram que o HAdV está entre os vírus mais frequentemente detectados durante o ano todo, provavelmente devido à sua grande estabilidade no ambiente aquático (ENRIQUEZ; HURST; GERBA, 1995; FONG; LIPP, 2005). Esses estudos corroboram com o resultado encontrado no presente trabalho, visto que o HAdV foi encontrado ao longo de todo o período de coleta (Figuras 10 e 11).

Por outro lado, os enterovírus não se apresentaram constantes entre os pontos da Lagoa do Peri ao longo do tempo (Tabela 3). Esse fato pode ser explicado pela maior sensibilidade e especificidade da reação de qPCR quando comparada ao PCR convencional, principalmente quando há um passo adicional de transcrição reversa, o que diminui a sensibilidade da técnica (GIRONES et al., 2010). Além disso, deve-se ressaltar a maior labilidade de vírus de RNA simples fita quando comparado aos vírus de DNA dupla fita que tem maior resistência no ambiente aquático (ENRIQUEZ; HURST; GERBA, 1995; FONG; LIPP, 2005). Portanto, esses dois fatores influenciam no aumento da detecção de amostras positivas para adenovírus humano (Figura 10) em relação aos enterovírus (Tabela 3).

Deste modo, na Lagoa do Peri, 27% das amostras apresentaram resultado positivo para enterovírus: 50% no Centro da Lagoa, 16,7% no Ambiente Conservado, 16,7% no Ambiente Degradado e 25% no ponto de Captação de Água (Tabela 3). No período de Junho à Outubro de 2010, houve 77% de prevalência (10/13) de amostras positivas para enterovírus. Uma possível explicação para esse resultado seria que esse período correspondeu ao período da Campanha Nacional de Vacinação contra a Poliomielite (nos meses de Junho à Julho de 2010) (DIVE, 2010) e ao período de excreção do vírus nas fezes por indivíduos saudáveis, que ocorre por, em média, três meses, o que justificaria a presença de 77% dos enterovírus no ambiente neste período. As três amostras que estão fora deste período podem ter sido detectadas devido à resistência viral ou até mesmo introduzidas no ambiente por indivíduos imunocomprometidos, que tem o período de excreção viral estendido (SELLWOOD et al., 1994; WHO, 2003; WOOD; SUTTER; DOWDLE, 2000). Todavia, quando analisada a viabilidade em cultura celular, detectou-se viável somente enterovírus não-pólio, ou seja, possivelmente os poliovírus vacinais derivados das campanhas de vacinação foram detectados somente no ensaio de RT-PCR, já que não estavam viáveis para provocar ECP em cultura celular ou a quantidade de vírus viáveis não era suficiente para produzir ECP.

O tratamento de água realizado pela Associação de Moradores da SAC é feito por meio de pastilhas de Cloro, como pode ser visualizada na Figura 2. É relatado na literatura que o tratamento de água por meio de cloração é um fator capaz de inativar o HAdV (PAGE; SHISLER; MARINAS, 2009; KAHLER et al., 2010), assim como os enterovírus (GERBA; NWACHUKU; RILEY, 2003). Entretanto, de acordo com dados de Cloro Residual Livre, gentilmente cedidos pela Vigilância Sanitária de Florianópolis, os valores mensurados *in locu*

realizado nos meses de coleta deste trabalho relatam índices insatisfatórios ao mínimo exigido pela Portaria MS nº 518/2004, que é de 0,2 mg/L em toda rede de distribuição (Anexo I) (ANVISA, 2004). Este fato denota a falta de tratamento efetivo da água, que se reflete na positividade de índices microbiológicos virais.

Deste modo, as amostras coletadas na SAC apresentaram 100% de positividade, tanto para enterovírus quanto para adenovírus humano. Pelo fato deste ponto de coleta estar localizado onde há extensa urbanização, é possível que haja uma contaminação intermitente dos mananciais. Considerando também os insatisfatórios índices de Cloro Residual Livre (Anexo I), esses fatores podem justificar a positividade em todos os meses de coletas. Este estudo é inédito no que diz respeito à análise da presença de vírus entéricos em águas de Soluções Alternativas de Abastecimento Coletivo.

Quanto às amostras coletadas na Escola, foram encontradas 83% de amostras positivas, tanto para enterovírus quanto para adenovírus humano. É importante ressaltar que a montante do ponto de coleta existem residências que possivelmente são as responsáveis por contaminar intermitentemente essa fonte de água que, além disso, não recebe nenhum tratamento químico para sua potabilidade.

De modo geral, foi encontrada positividade de 40% das amostras para enterovírus. Após ensaios de viabilidade, foram visualizados ECP em 100% das amostras submetidas à linhagem RD, no entanto, nenhuma apresentou ECP quando inoculada em linhagem L20b. Esse resultado indica a presença de enterovírus não-poliovírus viáveis nas amostras, o que não exclui a provável presença de poliovírus não viáveis, que após as campanhas de vacinação em massa, são encontrados no ambiente em grandes quantidades (PAVLOV et al., 2005; WHO, 2003). Diversos estudos relatam a presença de enterovírus em amostras de águas tratadas para consumo humano, em rios, em nascentes de água, em água de poço, e inclusive com alta prevalência de enterovírus não-pólio, como vírus coksackie B (EHLERS, GRABOW, PAVLOV, 2005) e enterovírus cepa 71 (HSU; CHEN; WAN, 2007). A maioria dos estudos realizados sugere que a resistência do coksackievirus é de, no mínimo, dez vezes maior quando comparado ao poliovírus (GERBA; NWACHUKU; RILEY, 2003), justificando deste modo estudos de viabilidade de enterovírus não-pólio.

A presença de enterovírus não-polio no ambiente comprovou que, embora esse vírus seja efetivamente eliminado nas fezes das crianças vacinadas, sua natureza atenuada deve conferir uma maior susceptibilidade dos mesmos aos processos usuais de desinfecção

(cloração). Essa característica apresenta vantagens e desvantagens importantes. A desvantagem principal é que a maior susceptibilidade dos vírus vacinais impediria, de certa forma, a “imunização de rebanho”, estratégia esta que é benéfica para a cobertura da vacinação em uma comunidade (WHO, 2004). A principal vantagem é que, esta maior susceptibilidade do vírus no meio ambiente, forneceria uma maior segurança que os mesmos não sofrerão mutações que podem reverter para a forma selvagem e serem causadores de poliomielite paralítica associada à vacina (VAAP), sendo esse um fator preocupante para as crianças imunocomprometidas, que devem receber a imunização por vacina Salk, que utiliza poliovírus inativados.

Estudos sobre a infecciosidade viral geralmente se referem às metodologias de visualização de efeito citopático em cultura celular. Entretanto, esse é um processo laborioso e alguns vírus apresentam a limitação de não produzir efeitos citopáticos em cultura celular, exigindo o desenvolvimento de metodologias alternativas (RODRÍGUEZ, PEPPER, YERBA, 2009). Recentemente, Nuanualsuwan e Cliver (2002b) iniciaram uma nova aplicação de metodologia ao tratar as amostras com suspensões de diferentes vírus de genoma RNA com enzima RNase após diversos tratamentos de inativação, como luz ultravioleta, visando detectar somente partículas virais íntegras. Em 2006, Bofill-Mas et al. trataram amostras de esgoto com enzima DNase, e não observaram diferenças notáveis nos níveis de HAdV e Poliomavírus Humano cepa JC, em relação à amostra não tratada, concluindo desta forma que todos os genomas detectados provinham de partículas virais íntegras. Em 2011, Viancelli et al. aplicaram esta metodologia em amostras provenientes de sistemas de tratamento de dejetos suínos, confirmando mais uma vez a aplicabilidade desta técnica.

Assim sendo, esta nova abordagem de metodologia molecular foi usada para inferir sobre partículas virais íntegras de HAdV. Para isso, todas as amostras que apresentaram resultado positivo no ensaio de qPCR dos pontos de Captação de Água, SAC e Escola foram submetidas ao tratamento enzimático com DNase I. Em seis momentos houve a detecção de somente partículas virais não íntegras, e quanto ao restante das amostras houve redução de 1 a 3 logaritmos, com valores constantes de 10^5 e 10^6 cópias genômicas por litro (Figuras 12, 13 e 14).

Essa redução pode estar relacionada com uma maior inativação e degradação do capsídeo por meio da radiação ultravioleta emitida pelo sol, que apesar do material genético ser o alvo principal de degradação, ocorre concomitantemente a degradação de proteínas do capsídeo, assim

como inativação pela temperatura, que provoca mudanças conformacionais ao capsídeo (GERBA; GRAMOS; NWACHUKU, 2002; NUANUALSUWAN; CLIVER, 2002a; THURSTON-ENRIQUEZ et al., 2003).

Entretanto, é conhecida a capacidade dos vírus se associarem às partículas presentes na água, o que os protege da degradação (BOSCH, 1998), o que justificaria os elevados valores de partículas íntegras encontrados. A SAC foi o ponto que apresentou maior frequência de vírus não íntegros (3/6), que possivelmente pode ter ocorrido pelo tratamento com pastilhas de Cloro, que apesar de estar em níveis baixos (Anexo I) e não ser efetiva para eliminar os vírus, foi capaz de provocar algum dano ao capsídeo, possibilitando desta forma a degradação do material genético pelo tratamento com a DNase I (PAGE; SHISLER; MARINAS, 2009; KAHLER et al., 2010).

Quanto à análise de coliformes totais e *Escherichia coli* nas amostras provenientes da SAC e Escola, em somente uma amostra coletada na Escola no mês de Maio de 2011 houve a presença de 100 UFC/100 mL, tanto para coliformes totais quanto para *E.coli* (Tabela 2). Apesar de apenas essa amostra ser positiva, esse valor excede o preconizado pela legislação (Portaria MS 518/2004) para águas de consumo humano, que prevê a ausência desses parâmetros microbiológicos, seja ela em fontes individuais como poços, minas, nascentes ou outras (ANVISA, 2004).

Os indicadores fecais deveriam estimar o risco da presença de patógenos entéricos somente quando o organismo indicador se comporta da mesma maneira que o patógeno no ambiente aquático. Entretanto, esse pré-requisito não é alcançado quando se usam bactérias como indicadores de vírus entéricos no ambiente, visto que as bactérias são muito mais lábeis no ambiente quando comparadas aos vírus entéricos (SKRABER et al., 2004). Assim, pode-se concluir que não existe relação de detecção entre vírus entéricos e indicadores bacterianos, conforme já descrito em outros estudos (HORMAN et al., 2004; MORESCO et al (2011); PINA et al., 1998; SKRABER et al., 2004), pois a presença de vírus entéricos não se limitou à presença de parâmetros bacteriológicos.

No que se refere à precipitação, os dados da média de chuva dos 7 dias anteriores à coleta estão demonstrados nas figuras 12, 13 e 14. O Teste de Correlação de Pearson obteve valor de $P > 0,005$, não obtendo correlação significativa quanto à quantidade de cópias genômicas de HAdV. Contudo, esse resultado não era esperado, visto que existe uma relação diretamente proporcional entre a precipitação e a incidência de

vírus entéricos, já que em momentos de muita chuva ocorre o transbordamento de esgotos, liberando dejetos não tratados e contaminando o ambiente com diversos patógenos, incluindo os vírus entéricos (MAALOUF; POMMEPUY; LE GUYADER, 2010). Por outro lado, elevados índices de precipitação podem diluir as águas de mananciais, o que diluiria também os vírus entéricos presentes.

Quanto ao ensaio de recuperação viral realizado mensalmente, foi estabelecido uma taxa de 10% de recuperação de HAdV. Isto significa que todos os resultados obtidos neste trabalho são referentes à somente 10% dos genomas virais presentes na amostra, ou seja, 90% não foram detectados. Entretanto, Katayama, Shimasaki e Ohgaki (2002) obtiveram taxa de 95% de recuperação de poliovírus semeados em água pura, seguindo os mesmos procedimentos deste estudo. Por outro lado, Fumian et al. (2010) relatou média de recuperação de somente 3,5% com amostras de esgoto diluídas em água, Moresco (2011) obteve recuperação de 2,8% para água do mar e Victoria et al. (2009) relatou taxa de recuperação viral de amostras de água de torneira 3%. Esses resultados sugerem que a detecção dos vírus entéricos depende da origem da água a ser avaliada. Esse método é descrito como sendo uma ferramenta útil em recuperar vírus entéricos de amostras ambientais.

Sabendo que as amostras ambientais podem conter substâncias orgânicas e/ou inorgânicas que podem ser tóxicas às células, foram realizados ensaios de citotoxicidade com o objetivo de detectar em qual diluição as amostras de água dos três pontos de coleta não apresentaram citotoxicidade frente à linhagem celular RD, já que essa é a linhagem que entrou em contato direto com a amostra ambiental concentrada.

Com os valores estabelecidos, os efeitos citopáticos visualizados na linhagem celular seriam referentes somente à infecção viral, sendo descartada uma possível alteração morfológica nas células por ação citotóxica das amostras. O ensaio de citotoxicidade demonstrou então, que as amostras puras provenientes da Escola e Captação de água da Lagoa do Peri foram citotóxicas à linhagem RD. Isso poderia ser explicado pelo fato que a água desses pontos de coleta não recebe nenhum tratamento para sua potabilidade, não eliminando possíveis microrganismos, balanceando o pH ou retirando matéria orgânica presentes na amostra. Esses fatores poderiam danificar as células, como foi visualizado na Figura 6. Por outro lado, a amostra de água pura proveniente da SAC não se apresentou citotóxica, provavelmente devido ao seu tratamento com cloro.

Os resultados apontados neste trabalho evidenciam a falta de cuidados quanto ao despejo de efluentes humanos em Florianópolis, contaminando desta forma as águas de mananciais que são ou poderiam ser utilizadas como fonte de abastecimento de água para população. Adicionalmente, devem ser tomadas medidas efetivas de desinfecção de água, no que se refere aos vírus entéricos, como a inativação por luz ultravioleta, cloração e ozônio (GERBA; GRAMOS; NWACHUKU, 2002; GERBA; NWACHUKU; RILEY, 2003; KO; CROMENS; SOBSEY, 2005; NUANUALSUWAN; CLIVER, 2002a).

6. Sumário dos principais resultados do presente trabalho

1. Foi possível detectar o material genético de adenovírus e enterovírus em todos os pontos de águas de mananciais;
2. Os ensaios de viabilidade para enterovírus mostraram a presença de enterovírus não-pólio viáveis em todas as amostras previamente positivas por RT-PCR;
3. Não foi detectado poliovírus viável em nenhuma amostra analisada;
4. O ensaio de integridade de HAdV demonstrou a presença de partículas virais íntegras, com potencial infeccioso;
5. A detecção de vírus entéricos não foi limitada à presença de indicadores bacteriológicos como coliformes totais e *E. coli*;
6. A média da precipitação dos 7 dias anteriores à coleta não exerceu efeito sobre a detecção dos vírus entéricos avaliados;

7. Conclusão

A realização do presente trabalho de TCC permitiu verificar que a contaminação das águas de mananciais por vírus entéricos de natureza infecciosa é uma realidade, comprovando que há contaminação dessas águas por dejetos de origem humana, o que é preocupante já que essas águas são usadas para consumo humano. Exigindo, desta forma, que medidas efetivas de desinfecção de água sejam tomadas no que concerne aos vírus entéricos

Também ressalta, mais uma vez, a falta de correlação entre a presença de vírus entéricos e parâmetros bacteriológicos, colaborando para a inclusão das análises virais para o monitoramento da qualidade das águas.

8. Perspectivas

As amostras que apresentaram viabilidade quanto aos enterovírus serão encaminhadas à Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) para realização de sequenciamento, a fim de caracterizar filogeneticamente os vírus presentes e infecciosos. Além disso, as amostras positivas para HAdV por qPCR estão sendo submetidas ao ensaio de formação de placas de lise, que permitirá a comparação deste ensaio com as técnicas de qPCR e tratamento enzimático por DNase.

9. Referências

ABES – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ENGENHARIA SANITÁRIA – SEÇÃO SÃO PAULO. **Subsídios para legislação nacional de água para consumo humano**. Ano I, v. 1, nº 1, 2010.

ALBINANA-GIMENEZ, N.; MIAGOSTOVICH, M. P.; CALGUA, B.; HUGUET, J. M.; MATIA, L.; GIRONES, R. Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking-water treatment plants. **Water Research**, v. 43, p. 2011–2019, 2009.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Portaria Nº 518/GM de 25 de março de 2004**. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/GM/GM-518.htm>>. Acesso em: 18 de maio de 2011.

ATMAR, R. L.; METCALF, T. G.; NEILL, F. H.; ESTES, M. K. Detection of enteric viruses in oysters by using the Polymerase Chain Reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 631-635, 1993.

BÁNYAI, K.; MARTELLA, V.; MELEG, E.; KISFALI, P.; PÉTERFI, Z.; BENKÖ, M.; MELEGH, B.; SZU, G. Searching for HAdV-52, the putative gastroenteritis-associated human adenovirus serotype in Southern Hungary. **New Microbiologica**, v.32, p. 185-188, 2009.

BOFILL-MAS, S.; ALBINANA-GIMENEZ, N.; CLEMENTE-CASARES, P.; HUNDESA, A.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; ALLARD, A.; CALVO, M.; GIRONES, R. Quantification and Stability of Human Adenoviruses and Polyomavirus JCPyV in Wastewater Matrices. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 12, p. 7894–7896, 2006.

BOSCH, A. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. **International Microbiology**, v. 1, p.191–196, 1998.

BOSCH, A.; GUIX, S.; SANO, D. e PINTO, R. M. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. **Current Opinion in Biotechnology**, v.19, n.3, p.295-301. 2008.

CALGUA, B.; MENGEWEIN, A.; GRÜNERT, A.; BOFILL-MAR, S.; CLEMENTE-CASARES, P.; HUNDESA, A.; WYN-JONES, A. P.; LÓPEZ-PILA, J. M.; GIRONES, R. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. **Journal of Virological Methods**, v. 153, n. 2, p. 79-83, 2008.

CARDOSO, F. S.; PEREIRA, G.; AGUDO-PADRÓN, A. I.; NASCIMENTO, C.; ABDALLA, A. Análise do uso e ocupação da terra na bacia da Lagoa do Peri, Florianópolis, SC. **Caminhos de Geografia**, v. 9, n. 27, p. 201 – 213, 2008.

CASAN – COMPANHIA CATARINENSE DE ÁGUAS E SANEAMENTO. **História do Saneamento Básico de Florianópolis: Águas – Esgotos – Lixo**. Disponível em: <<http://www.casan.com.br/index.php?sys=241>>. Acesso em: 17 de maio de 2011.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Poliomyelitis prevention in the United States: introduction of a sequential vaccination schedule of inactivated poliovirus vaccine followed by oral poliovirus vaccine; Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **MMWR - Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports**, v. 46, p. 1-25, 1997.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Update on vaccine-derived polioviruses - worldwide, January 2008-June 2009. **MMWR - Morbidity and mortality weekly report**, v.58, p. 1002- 1006, 2009.

CONAMA – CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **A Resolução Nº 274 de 29 de Novembro de 2000**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res00/res27400.html>>. Acesso em: 18 de maio de 2011.

DIVE, DIRETORIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Informe Técnico Campanha Nacional De Vacinação Contra A Poliomielite – 2010**. Gerência de Vigilância de Doenças Imunopreveníveis e Imunização, 2010.

EHLERS, M. M.; GRABOW, W. O. K.; PAVLOV, D. N. Detection of enterovirus in untreated and treated drinking water supplies in South Africa. **Water Research**, v. 39, p. 2253-2258, 2005.

ENRIQUEZ, C.E., HURST, C.J.; GERBA, C.P. Survival of the enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea and wastewater. **Water Research**, v. 29, p. 2548-2553, 1995.

FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**, Philadelphia: Lippincott-Williams&Wilkins, 5 ed, v.1, p. 3177, 2007.

FONG, T.T.; LIPP, E.K. Enteric viruses of human and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, p. 357-371, 2005.

FUMIAN, T. M.; LEITE, J. P. G.; CASTELLO, A. A.; GAGGERO, A.; CAILLOU, M. S. L.; MIAGOSTOVICH, M. P. Detection of rotavirus A in sewage samples using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution methods for virus concentration. **Journal of Virological Methods**, v. 170, p. 42-46, 2010.

GERBA, C. P. Survival of Viruses in the Marine Environment. In: BELKIN, S. S.; COWELL, R. R. **Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment**. New York, p. 133-142, 2005.

GERBA, C. P.; NWACHUKU, N.; RILEY, K. R. Disinfection resistance of waterborne pathogens on the United States Environmental Protection Agency's Contaminant Candidate List (CCL). **Journal of Water Supply: Research and Technology – AQUA**, v. 52, p. 81-94, 2003.

GERBA, C. P.; GRAMOS, D. M.; NWACHUKU, N. Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV light. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p.5167-5169, 2002.

GIRONES, R.; FERRÚS, M. A.; ALONSO, J. L.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; CALGUA, B.; CORRÊA, A. A.; HUNDESA, A.; CARRATALA, A.; BOFILL-MAS, S. Molecular detection of pathogens in water - The pros and cons of molecular techniques. **Water Research**, v. 44, p. 4325-4339, 2010.

HORMAN, A.; RIMHANEN-FINNE, R.; MAUNULA, L.; von BONSDORFF, C. H.; TORVELA, N.; HEIKINHEIMO, A.; HANNINEN, M. L. *Campylobacter* spp., *Girardia* spp., *Cryptosporidium* spp., Noroviruses and indicator organisms in surface water in southwestern Finland, 2000-2001. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 87-95, 2004.

HERNROTH, B.E.; CONDEN-HANSSON, A. C.; REHNSTAN-HOLM, A. S.; GIRONES, R.; ALLARD, A. K. Environmental Factors Influencing Human Viral Pathogens and Their Potential Indicator Organisms in the Blue Mussel, *Mytilus edulis*: the First Scandinavian Report. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4523-4533, 2002.

HSU, B. M.; CHEN, C. H.; WAN, M. T. Genetic diversity of epidemic enterovirus 71 strains recovered from clinical and environmental samples in Taiwan. **Virus Research**, v. 126, p. 69-75, 2007.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico**, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de População e Indicadores Sociais, 2008.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Indicadores de Desenvolvimento Sustentável: Brasil 2010**. Rio de Janeiro, 2010.

JONES II, M. S.; HARRACH, B.; GANAC, R. D.; GOZUM, M. M. A.; DELA CRUZ, W. P.; RIEDEL, B.; PAN, C.; DELWART, E. L.; SCHNURR, D. P. New Adenovirus Species Found in a Patient Presenting with Gastroenteritis. **Journal of Virology**, v. 81, n. 11, p. 5978-5984. 2007.

KAHLER, A. M.; CROMEANS, T. L.; ROBERTS, J. M.; HILL, V. R. Effects of Source Water Quality on Chlorine Inactivation of Adenovirus, Coxsackievirus, Echovirus, and Murine Norovirus. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, n.15, p.5159-5164. 2010.

KARAGANIS, J. V.; LARKIN E. P.; MELNICK J. L.; SCARPINO P. V.; SCHAUB S. A.; SORBER C. A.; SULLIVAN R.; WELLINGS F. M. Research priorities for monitoring viruses in the environment. EPA-600/9-83-010. U.S. **Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Environmental Monitoring and Support Laboratory, Cincinnati**. 1983.

KATAYAMA, H.; SHIMASAKI, A.; OHGAKI, S. Development of a Virus Concentration Method and Its Application to Detection of Enterovirus and Norwalk Virus from Coastal Seawater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1033–1039, 2002.

KO, G.; CROMEANS, T. L.; SOBSEY, M. D. UV inactivation of adenovirus type 41 measured by cell culture mRNA RT-PCR. **Water Research**, v. 39, p. 3643-3649, 2005.

LAGO, P. F. Florianópolis: a polêmica urbana. Florianópolis, **Fundação Franklin Cascaes**, 312p. 1996.

LAPOLLI, E. M.; MOREIRA, J. C.; ZARDO, S. M.; VIEIRA, V. F. **Carta dos elementos do meio ambiente – Parque da Lagoa do Peri**, Florianópolis, SC: LARS/SC, Memorial descritivo, 24 p, 1990.

LISBOA, L. K. **Estrutura e Composição da fauna de macroinvertebrados bentônicos da Lagoa do Peri**. Trabalho de Conclusão de Curso, UFSC, Florianópolis, 44 p. 2009.

LODDER, W. J.; VAN DEN BERG, H. H. J. L.; RUTJES, S. A.; HUSMAN, A. M. R. Presence of enteric viruses in source waters for drinking water production in the Netherlands. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 5965-5961, 2010.

MAALOUF, H.; POMMEPUY, M.; LE GUYADER, F. S. Environmental conditions leading to shellfish contamination and related outbreaks. **Food and Environmental Virology**, v. 2, p. 136-145, 2010.

McFETERS, A. G.; BISSONNETTE, G. K.; JEZESKI, J. J.; THOMSON, C. A.; STUART, D. G. Comparative survival of indicator bacteria and enteric pathogens in well water. **Applied Microbiology**, v. 27, p. 823-829, 1974.

MORESCO, V. Detecção e quantificação de patógenos entéricos virais em amostras de água do mar. Dissertação de Mestrado, UFSC, Florianópolis, 125 p. 2011.

MORESCO, V.; VIANCELLI, A.; NASCIMENTO, M. A.; SOUZA, D. M. S.; RAMOS, A. P. D.; GARCIA, L. A. T.; SIMÕES, C. M. O.; BARARDI, C. R. M, *in press*. Microbiological and physicochemical analysis of the coastal waters of southern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**. 2011. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.10.026.

NUANUALSUWAN, S.; CLIVER, D. O. Infectivity of RNA from inactivated poliovirus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 1629-1632, 2002a.

NUANUALSUWAN, S.; CLIVER, D.O. Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. **Journal of Virological Methods**, v. 104, p. 217-225, 2002b.

OKOH, A. I.; SIBANDA, T.; GUSHA, S. S. Review: Inadequately Treated Wastewater as a Source of Human Enteric Viruses in the Environment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, p. 2620-2637, 2010.

PAGE, M. A.; SHISLER, J. L.; MARINAS, B. J. Kinetics of adenovirus type 2 inactivation with free chlorine. **Water Research**, v.43, n.11, p.2916-2926, 2009.

PAVLOV, D.N.; Van Zyl, W.B; Van Heerden, J.; Grabow, W.O.K.; Ehlers, M.M. Prevalence of vaccine-derived polioviruses in sewage and river water in South Africa. **Water Research**, v. 39, p. 3309-3319, 2005.

PAYMENT, P.; TRUDEL, M.; PLANTE, R. Elimination of viruses and indicator bacteria at each step of treatment during preparation or drinking water at seven water treatment plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, p. 1418-1428, 1985.

PINA, S.; PUIG, N.; LUCENA, F.; JOFRE, J.; GIRONES, R. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 3376-3382, 1998.

PMISB - PLANO MUNICIPAL INTEGRADO DE SANEAMENTO BÁSICO. **Produto 4: Diagnóstico do setor de abastecimento de água.** RELATÓRIO Nº RL-0309-800-942-MPB-004. Abril de 2009. Disponível em: <http://portal.pmf.sc.gov.br/arquivos/arquivos/pdf/19_07_2010_17.53.14.8a01bc3f9c234ec98970a56f2a0812ef.pdf>. Acesso em: 24 de outubro de 2011.

POND, K. Plausibility of Associated Infections Acute Effects, Sequelae and Mortality . **Water Recreation and Disease – WHO**. 2005.

PUIG, N.; LUCENA, F.; JOFRE, J.; GIRONES, R.; ALLARD, A.; WADELL, G. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested-PCR amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 2963-2970, 1994.

RIGOTTO, C. B. **Aplicação de métodos moleculares e de cultivo celular no monitoramento de vírus entéricos no ambiente aquático.** Tese de Doutorado, UFSC, Florianópolis, 179 p. 2009.

RIGOTTO, C.; VICTORIA, M.; MORESCO, V.; KOLESNIKOVAS, C.K.; CORRÊA, A.A.; SOUZA, D.S.M.; MIAGOSTOVICH, M.P.; SIMÕES, C.M.O.; BARARDI, C.R.M. Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental samples in Florianopolis, South Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 1979–1987, 2010.

RODRÍGUEZ, R.A.; PEPPER, I.L.; YERBA, C.P. Application of PCR-based methods to assess the infectivity of enteric viruses in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 297–307, 2009

ROIIVAINEN, M.; BLOMQVIS, T. S.; AL-HELLO, H.; PAANANEN, A.; DELPEYREUX, F.; KUUSI, M.; HOVI, T. Highly divergent neurovirulent vaccine-derived polioviruses of all three serotypes are recurrently detected in Finnish sewage. **Euro Surveillance**, v. 15, p.1-4, 2010.

SANTOS, A. P. T.; RUSSO, D. H.; MACHADO, B. C.; LUCHS, A.; TIMENETSKY, M. C. S. T.; CARMONA, R. C. C. Echovírus 6

associado à doença exantemática. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 672-675, 2008.

SANTOS, N. S. O.; WIGG, M. D.; ROMANOS, M. T. V.; **Introdução à Virologia Humana**. Editora Guanabara Koogan. 2. ed. Rio de Janeiro, 2008. 248p.

SELLWOOD, J.; LITTON, P. A.; MCDERMOTT, J.; CLEWLEY, J. P. Studies on wild and vaccine strains of poliovirus isolated from water and sewage. **Water Science and Technology**, v. 31, p. 317-321, 1994.

SCIPIONI, A.; DAUBE, G.; THIRY, E. Contamination of food and water by human pathogenic viruses. **Annales de Medecine Veterinaire**, v.144, n.4, p. 207-221, 2000.

SILVA, A. Á. S. **Parque municipal da Lagoa do Peri: Subsídios para gerenciamento ambiental**. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, p.120, 2000.

SIMONASSI, J. C. **Caracterização da lagoa do Peri, através da análise de parâmetros físico-químicos e biológicos, como subsidio ao gerenciamento dos recursos hídricos da Ilha de Santa Catarina, SC, Brasil**. Dissertação de Mestrado, UFSC, Florianópolis, 74 p. 2001.

SKRABER, S.; GASSILLOUD, B.; SCHWARTZBROD, L.; GANTZER, C. Survival of infectious Poliovirus-1 in river water compared to the persistence of somatic coliphages, thermotolerant coliforms and Poliovirus-1 genome. **Water Research**, v. 38, p. 2927 – 2933, 2004.

THURSTON-ENRIQUEZ, J. A.; HAAS, C. N.; JACANGELO, J.; RILEY, K. e GERBA, C. P. Inactivation of feline calicivirus and adenovirus type 40 by UV radiation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.1, p.577-582. 2003.

VAN HEERDEN, J.; EHLERS, M. M.; VAN ZYL, W. B.; GRABOW, W. O. K. Incidence of adenoviruses in raw and treated water. **Water Research**, v.37, n.15, p.3704-3708. 2003.

VERHEYEN, J.; TIMMEN-WEGO, M.; LAUDIEN, R.; BOUSSAAD, I.; SEN, S.; KOC, A.; UESBECK, A.; MAZOU, F.; PFISTER, H. Detection of Adenoviruses and Rotaviruses in Drinking Water Sources Used In Rural Areas of Benin, West Africa. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 2798–2801, 2009.

VIANCELLI, A.; GARCIA, L.A.T.; KUNZ, A.; STEINMETZ, R.; ESTEVES, P.A.; BARARDI, C.R.M, *in press*. Detection of circoviruses and porcine adenoviruses in water samples collected from swine manure treatment systems. **Research in Veterinary Science**. 2011. doi:10.1016/j.rvsc.2011.07.022.

VICTORIA, M.; GUIMARÃES, F.; FUMIAN, T.; FERREIRA, F.; VIEIRA, C.; LEITE, J. P.; MIAGOSTOVICH, M. Evaluation of an adsorption–elution method for detection of astrovirus and norovirus in environmental waters. **Journal of Virological Methods**, v. 156, p. 73–76, 2009.

VICTORIA, M.; RIGOTTO, C.; MORESCO, V.; DE ABREU CORRÊA, A.; KOLESNIKOVAS, C.; LEITE, J. P. G.; MIAGOSTOVICH, M. P.; BARARDI, C. R. M. Assessment of norovirus contamination in environmental samples from Florianópolis City, Southern Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 231–238, 2010.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Polio laboratory manual. WHO/IVB/04.10. **World Health Organization, Geneva, Switzerland**. 4. ed. 2004.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation. WHO/V&B/03.03. **Vaccines and Biologicals**. 2003.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION; UNICEF. Global Water Supply and Sanitation Assessment 2000 Report. **Water Supply & Sanitation – Colaborative Council**. 2000.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION; UNICEF. **Progress on sanitation and Drinking-water: 2010 Update**. 2010

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION; UNICEF. **Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done.** 2009

WOOD, J. D.; SUTTER, R. W.; DOWDLE, W. R. Stopping poliovirus vaccination after eradication: issues and challenges. Round Table. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 78, p. 347 – 362, 2000.

WYN-JONES, A. P.; SELLWOOD, J. Enteric viruses in the aquatic environment. **Journal Applied Microbiology**, v. 91, p. 945-962, 2001.

WYN-JONES, A. P.; CARDUCCI, A.; COOK, N.; D'AGOSTINO, M.; DIVIZIA, M.; FLEISCHER, J.; GANTZER, C.; GAWLER, A.; GIRONES, R.; HOLLER, C.; HUSMAN, A. M. R.; KAY, D.; KOZYRA, I.; LÓPEZ-PILA, J.; MUSCILLO, M.; NASCIMENTO, M. S. J.; PAPAGEORGIOU, G.; RUTJES, S.; SELLWOOD, J.; SZEWZYK, R.; WYER, M. Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. **Water Research**, v. 45, p. 1025-1038, 2011.

10. Anexo I - Laudo de Análise de Água ACOLJOGOC



PREFEITURA DE FLORIANÓPOLIS
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE
DIRETORIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE
GERÊNCIA DO LABORATÓRIO DE SAÚDE PÚBLICA - LAMUF
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES DE PRODUTOS E MEIO AMBIENTE

LAUDO DE ANÁLISE DE ÁGUA PARA CONSUMO Nº 173 / 2011

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA

| | | | |
|---|--|---|--|
| Tipo de Abastecimento SOLUÇÃO ALTERNATIVA COLETIVA | | Instituição ou Responsável ACOLJOGOC III | |
| Tipo de Água TRATADA / CLORADA | | | |
| Endereço: Rua Domicia Maria da Costa, 503, Saco Grande - FLORIANÓPOLIS | | | |
| Ponto de Coleta: Direta da rede / Cavalete | | Nome Coletador: Suami Gularte Cardoso | |
| Data: 03/02/2011 | | Data: 03/02/2011 | |
| Hora: 11:10 | | Hora: 12:00 | |

LEITURAS DE CAMPO

| | |
|-----------------------------------|---|
| Cloro Residual livre 0,11 mg/L | Valores de Referência: (Portaria MS 518/2004) Mínimo exigido na rede de distribuição 0,2 mg/L Máximo recomendado na rede de distribuição 2,0 mg/L |
| pH --- | Recomendado entre 6,0 e 9,5 na rede de distribuição |

RESULTADOS ANALÍTICOS

Características Físico-Químicas

| PARÂMETRO | VALOR | MÉTODO | Valores de Referência: (Portaria MS 518/2004) |
|-----------|----------|---------------|---|
| COR | 14,0 uH | Colorimétrico | Sem mudanças anormais |
| pH | 6,78 | | Recomendado entre 6,0 e 9,5 |
| Turbidez | 1,58 UT | Nefelométrico | Máx. 5 UT |
| Fluoreto | --- mg/L | Colorimétrico | Máx. 1,5 mg/L |

Características Microbiológicas

| PARÂMETRO | VALOR | MÉTODO | Valores de Referência: (Portaria MS 518/2004) |
|-------------------|-----------------|------------|---|
| Coliformes Totais | Presença em 100 | Enzimático | Ausência em 100 ml |
| Escherichia coli | Presença em 100 | Enzimático | Ausência em 100 ml |

CONCLUSÃO

A amostra analisada NÃO ATENDE aos padrões de potabilidade estabelecidas na Portaria MS 518/2004 no que se refere as características abordadas no presente laudo.

Obs: Não é permitida a reprodução parcial do laudo. Os resultados referem-se a amostra recebida.

FLORIANÓPOLIS, 07/02/2011

Lisiane Pagnussat - CRRSC: 8852
Farmacêutico Responsável Técnico
SMS / PMF

João Batista Simões Pires Neto - CRF/SC: 9458
Farmacêutico
SMS / PMF



PREFEITURA DE FLORIANÓPOLIS
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE
DIRETORIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE
GERÊNCIA DO LABORATÓRIO DE SAÚDE PÚBLICA - LAMUP
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES DE PRODUTOS E MEIO AMBIENTE

LAUDO DE ANÁLISE DE ÁGUA
PARA CONSUMO
Nº 475 / 2011

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA

| | | | |
|---|-------|----------------------------|-------|
| Tipo de Abastecimento | | Instituição ou Responsável | |
| SOLUÇÃO ALTERNATIVA COLETIVA | | ACOLILOGOC | |
| Tipo de Água | | | |
| TRATADA / CLORADA | | | |
| Endereço: | | | |
| Rua Donica Maria da Costa, 503, Sago Grande - FLORIANÓPOLIS | | | |
| Ponto de Coleta: | | Nome Coletador: | |
| Direta da rede / Cavalete | | SUAMI GILARTE CARDOSO | |
| Coleta | | Entrada no Laboratório | |
| Data: | Hora: | Data: | Hora: |
| 13/04/2011 | 15:40 | 13/04/2011 | 17:00 |

LEITURAS DE CAMPO

| | | |
|----------------------|-----------|---|
| Cloro Residual livre | 0,06 mg/L | Valores de Referência: (Portaria MS 518/2004) |
| | | Mínimo exigido na rede de distribuição 0,2 mg/L |
| | | Máximo recomendado na rede de distribuição 2,0 mg/L |
| pH | -- | Recomendado entre 6,0 e 9,5 na rede de distribuição |

RESULTADOS ANALÍTICOS

| Características Físico-Químicas | | | |
|---------------------------------|---------|---------------|---|
| PARÂMETRO | VALOR | MÉTODO | Valores de Referência: (Portaria MS 518/2004) |
| COR | 11,0 uH | Colorimétrico | Sem mudanças anormais |
| pH | 6,54 | | Recomendado entre 6,0 e 9,5 |
| Turbidez | 0,96 UT | Nefelométrico | Máx. 5 UT |
| Fluoreto | -- mg/L | Colorimétrico | Máx. 1,5 mg/L |

| Características Microbiológicas | | | |
|---------------------------------|-----------------|------------|---|
| PARÂMETRO | VALOR | MÉTODO | Valores de Referência: (Portaria MS 518/2004) |
| Coliformes Totais | Presença em 100 | Enzimático | Ausência em 100 ml |
| Escherichia coli | Presença em 100 | Enzimático | Ausência em 100 ml |

CONCLUSÃO

A amostra analisada NÃO ATENDE aos padrões de potabilidade estabelecidos na Portaria MS 518/2004 no que se refere as características abordadas no presente laudo.

Obs: Não é permitida a reprodução parcial do laudo. Os resultados referem-se a amostra recebida.

FLORIANÓPOLIS, 19/04/2011

Lisiane Pagnussat - CRF/SC: 8852
Farmacêutico Responsável Técnico
SMS / PMF

João Batista Simões Pires Neto - CRF/SC: 9458
Farmacêutico
SMS / PMF



PREFEITURA DE FLORIANÓPOLIS
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE
DIRETORIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE
GERÊNCIA DO LABORATÓRIO DE SAÚDE PÚBLICA - LAMUF
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES DE PRODUTOS E MEIO AMBIENTE

LAUDO DE ANÁLISE DE ÁGUA
PARA CONSUMO
Nº 526 / 2011

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA

| | | | |
|--|----------------|---|----------------|
| Tipo de Abastecimento SOLUÇÃO ALTERNATIVA COLETIVA | | Instituição ou Responsável ACOLJOGOC | |
| Tipo de Água TRATADA / CLORADA | | | |
| Endereço: Rua Domítila Maria da Rosa, 503 - FLORIANÓPOLIS | | | |
| Ponto de Coleta: DIRETO DA REDE | | Nome Coletador: JOÃO CARLOS DOS SANTOS | |
| Coleta | | Entrada no Laboratório | |
| Data: 04/05/2011 | Hora: 15:25 | Data: 04/05/2011 | Hora: 16:15 |

LEITURAS DE CAMPO

| | | |
|----------------------|-----------|---|
| Cloro Residual livre | 0,13 mg/L | Valores de Referência: (Portaria MS 518/2004) Mínimo exigido na rede de distribuição 0,2 mg/L Máximo recomendado na rede de distribuição 2,0 mg/L |
| pH | -- | Recomendado entre 6,0 e 9,5 na rede de distribuição |

RESULTADOS ANALÍTICOS

| Características Físico-Químicas | | | |
|---------------------------------|---------|---------------|---|
| PARÂMETRO | VALOR | MÉTODO | Valores de Referência: (Portaria MS 518/2004) |
| COR | 11,0 uH | Colorimétrico | Sem mudanças anormais |
| pH | 6,18 | | Recomendado entre 6,0 e 9,5 |
| Turbidez | 1,98 UT | Nefelométrico | Máx. 5 UT |
| Fluoreto | mg/L | Colorimétrico | Máx. 1,5 mg/L |

| Características Microbiológicas | | | |
|---------------------------------|-----------------|------------|---|
| PARÂMETRO | VALOR | MÉTODO | Valores de Referência: (Portaria MS 518/2004) |
| Coliformes Totais | Ausência em 100 | Enzimático | Ausência em 100 ml |
| Escherichia coli | Ausência em 100 | Enzimático | Ausência em 100 ml |

CONCLUSÃO

A amostra analisada NÃO ATENDE aos padrões de potabilidade estabelecidos na Portaria MS 518/2004 no que se refere as características abordadas no presente laudo.

Obs: Não é permitida a reprodução parcial do laudo. Os resultados referem-se a amostra recebida.

FLORIANÓPOLIS, 09/05/2011

Lisiane Pagnussat - CRF/SC: 8852
Farmacêutica Responsável Técnico
SMS / PMF

João Carlos dos Santos
João Batista Simões Pires Neto - CRF/SC: 9458
Farmacêutico
SMS / PMF



PREFEITURA DE FLORIANÓPOLIS
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE
DIRETORIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE
GERÊNCIA DO LABORATÓRIO DE SAÚDE PÚBLICA - LAMUP
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES DE PRODUTOS E MEIO AMBIENTE

LAUDO DE ANÁLISE DE ÁGUA
PARA CONSUMO
Nº 733 / 2011

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA

| | | | |
|---|-------|----------------------------|-------|
| Tipo de Abastecimento | | Instituição ou Responsável | |
| SOLUÇÃO ALTERNATIVA COLETIVA | | ACOLJOGOC | |
| Tipo de Água | | | |
| TRATADA / CLORADA | | | |
| Endereço: | | | |
| Rua Domicia Maria da Costa, 503 - FLORIANÓPOLIS | | | |
| Ponto de Coleta: | | Nome Coletador: | |
| DIRETO DA REDE | | SUAMI GUILARTE CARDOSO | |
| Coleta | | Entrada no Laboratório | |
| Data: | Hora: | Data: | Hora: |
| 18/06/2011 | 10:10 | 18/06/2011 | 12:00 |

LEITURAS DE CAMPO

| | |
|----------------------|---|
| Cloro Residual livre | Valores de Referência: (Portaria MS 518/2004) |
| 0,08 mg/L | Mínimo exigido na rede de distribuição 0,2 mg/L |
| | Máximo recomendado na rede de distribuição 2,0 mg/L |
| pH | Recomendado entre 6,0 e 9,5 na rede de distribuição |
| -- | |

RESULTADOS ANALÍTICOS

| Características Físico-Químicas | | | |
|---------------------------------|---------|---------------|---|
| PARÂMETRO | VALOR | MÉTODO | Valores de Referência: (Portaria MS 518/2004) |
| COR | 3,0 uH | Colorimétrico | Sem mudanças anormais |
| pH | 6,78 | | Recomendado entre 6,0 e 9,5 |
| Turbidez | 0,23 UT | Nefelométrico | Máx. 5 UT |
| Fluoreto | mg/L | Colorimétrico | Máx. 1,5 mg/L |

| Características Microbiológicas | | | |
|---------------------------------|-----------------|------------|---|
| PARÂMETRO | VALOR | MÉTODO | Valores de Referência: (Portaria MS 518/2004) |
| Coliformes Totais | Presença em 100 | Enzimático | Ausência em 100 ml |
| Escherichia coli | Ausência em 100 | Enzimático | Ausência em 100 ml |

CONCLUSÃO

A amostra analisada NÃO ATENDE aos padrões de potabilidade estabelecidas na Portaria MS 518/2004 no que se refere as características abordadas no presente laudo.

Obs: Não é permitida a reprodução parcial do laudo. Os resultados referem-se a amostra recebida.

Alerta: Presença de coliformes totais, devendo ser investigada a origem da ocorrência e tomadas providências imediatas de caráter corretivo e preventivo, realizando em seguida nova análise de coliformes.

FLORIANÓPOLIS, 28/06/2011

Lisiane Pagnussat - CRF/SC: 8852
Farmacêutico Responsável Técnico
SMS / PMF


PATRÍCIA ALVES DE SOUZA - CRF/SC: 3381
Farmacêutico
SMS / PMF